

QP
501
J67

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoken; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XIII

TOKYO

1931

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki
MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIVOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XIII

TOKYO

1931

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki
MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XIII

TOKYO

1931

COPYRIGHT 1931

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS OF VOLUME XIII.

No. 1, January, 1931

	Page
INATSUGU, Y. On uric acid and allantoin in gastric juice	1
YANAGISAWA, Kaneo. Über die Wirkung der Antikoagulanten auf die Serumfermente und das Komplement	11
FUZIWARA, Kanzi. Phosphate im Harn bei Zufuhr von Gallensäure..	43
SUZUKI, Koretaka. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente	57
TANAKA, Kunio. Studies on the effect of metals and metal salts on microorganisms	81
KAWASHIMA, Yoshikane und CHIWAKI, Jinji. Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen Diät. I. Mitteilung. Über den Einfluss des Cholesterins und des Lecithins auf die Hämoglykolyse	107
KAWADA, Yutaka. Der Einfluss der Gallensäure auf die Salzausscheidung in der Lebergalle. (I)	133
SUYEYOSHI, Yuji. Über die Darstellung von Eigelblecithin	145
SUEYOSHI, Yuji und FURUKUBO, Tomiji. Über die Fettsäuren des Eigelblecithins. I. Mitteilung. Die gesättigten Fettsäuren	155
SUEYOSHI, Yuji und FURUKUBO, Tomiji. Über die Fettsäuren des Eigelblecithins. II. Mitteilung. Die ungesättigten Fettsäuren	177
FURUKUBO, Tomiji. Über den Gehalt der Gewebe an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen unter verschiedenen Bedingungen	185
MASAKI, Kiyoshi. On the CO ₂ absorption velocity of NaOH- und KOH- solutions	211

No. 2, April 1931

FUJITA, Sei. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. X. Über den Einfluss der Gallensäure und der Phosphate auf die Zuckerassimilation. III.	219
TAKU, Aijiro. Die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung bei Zufuhr verschiedener vegetativer Nervengifte	237
OHYAMA, Seiichi. Sur la purification de la toxine diphtérique	255
HÔDYÔ, H. Immunologische Untersuchungen über Blattpresssäfte und Blattfarbstoffe	273
TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in heated serum. Part I. The existence of a cold-hemotoxin in heated immune serum..	291
SAKAMOTO, Isamu und FUJIKAWA, Hosaburo. Eine Kritik der	

Nakagawa-Fujikawaschen roten Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der Galle	309
NAKAGAWA, Satoru und YOSHIKAWA, Koichi. Über die Nakagawasche Extraktionsmethode für Gallensäuren aus der Galle und deren theoretische Überlegungen	321
KUSUI, Kenzo. Zur Kenntnis der vergleichenden Biochemie. VIII. Über das Verhalten einiger heterocarboeyclischen Verbindungen im Froschorganismus	343
IWANAGA, Yoshio. Über den Einfluss der Narkotica auf die Zuckerausscheidungsschwelle	351
INOUE, Hiroshi. The formation of methylglyoxal from hexosephosphate in the presence of animal tissues	369

No. 3, August, 1931

MIYANOKI, Yasutaro. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente	389
SAKUMA, Futoshi. The fate of the glyoxals in the animal body	423
TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in heated serum. Part II. The cold, non-complementary hemolysis by the heated normal serum	441
FUZIWARA, Kanzi. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel. (IV) Calciumausscheidung im Kot bei Zufuhr von Cholsäure	465
MALHOTRA, R. C. Biochemical investigation of mosaic in solanum tuberosum	473
TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in heated serum. Part III. Experiments on its chemical nature and on the influence of substances inhibiting other sorts of hemolysis	489

ON URIC ACID AND ALLANTOIN IN GASTRIC JUICE.

By

Y. INATSUGU.

*(From the Department of Internal Medicine of the Nagasaki Medical College.
Director: Prof. Dr. M. Tsudji.)*

(Received for publication, July 19, 1930)

The question of the uricolysis in the metabolism of purin bodies is still in process of general discussion. Folin and some others(1924) succeeded in finding that the kidney has an ability to store uric acid. Brugsch(1922) found a large quantity of uric acid in the bile and named it "Enterotropische Harnsäure" and distinguished it from uric acid in the urine or "Urotropische Harnsäure." He declared also that the question of "Uricämie" can not be discussed without considering the uric acid excretion in liver. Yoshimura(1927) contributed much to the metabolism of purin bodies by finding a great deal of allantoin in the bile of dog. He named it "Entertropische Allantoin."

Recently, the stomach has been found to be not only a secretory organ, but is also regarded as an excretive organ. H. Steinitz (1928) and Scherk (1928) examined the gastric juice of many invalids and proved that the quantity of its non-protein nitrogen was almost equal to that in the blood and that when the nitrogen in the blood increased in consequence of renal insufficiency, it increased in the gastric juice at the same time. Ammonia, amino acid and urea were found every time as normal components of gastric juice of dog (Inoue, 1929) and man (Sumida and Hongo, 1930). The end products in the purin metabolism, therefore, may also be secreted together with gastric juice in the stomach and have some relations to the purin metabolism. Cohnheim (1926) wrote in his text book of physiology that there is nucleo-

proteid in gastric juice and Lapéz Suárez (1913) informed us that the mucin in the gastric juice of pig contains some nucleoproteid. As to uric acid, only T. Brugsch and J. Rother (1925), observing from the topographical point of view the distribution of the uric acid injected into the blood stream of guinea pigs examined its stomach together with the contents and proved quantitatively the presence of uric acid. But there is no information bearing on uric acid in gastric juice itself and its allantoin. So, I made an attempt to prove the presence of uric acid and allantoin in gastric juice.

First, I used a dog which had a gastric and a duodenal fistula. The duodenal fistula was made in order to keep duodenal juice from running back into the stomach. Next, I chose a dog with Pawlow stomach pouch whose stomach secretion was remarkably active. When I gave a large quantity of meat to this dog, the total quantity of secretion amounted to several hundred cc. within a few hours. Such a dog is very seldom obtained. Formerly, Tamaszewski (1918) had a dog whose stomach pouch secreted one litre in 24 hours, but the secretion decreased gradually after a week or ten days. The dog I got continued to secrete the same quantity of gastric juice for some months. I believe, therefore, that this instance is surely worth mentioning.

The collected gastric juice was filtered beforehand and uric acid was determined by Harpuder's method (1928) and allantoin by Wiechowski's.

EXPERIMENT I.

I injected 15 cc. of 15% methylguanidinnitrate as secretic stimulant into the vein of the thigh of the dog with two fistulae and collected the gastric juice. Testing it, I found 0,22 mg% of uric acid and 2,00 mg% of allantoin.

Next, from a dog with Pawlow pouch, I got pure gastric juice. Besides the ordinary meal, I gave him some meat just before the experiment and collected the pure gastric juice during the whole five hours. At this time, I got 0,07 to 0,13 mg%, an average of

0,09 mg% uric acid and 2,6 to 5,6 mg%, an average of 4,6 mg% allantoin as the following table shows. Thus I was convinced that uric acid and allantoin are normal elements of the gastric juice of dog.

Dog with gastro-duodenal fistula.

dat.	body weight (kg)	used G. juice (cem)	Ū in mg%	Allantoin in mg%	not.
30/VIII	20	40 100	0,22	2,0	5% Methyl-guanidinenitrate.

Dog of stomach pouch.

25/X	17,7	100		2,6	
8/XI	„	„	0,13		
19/XI	17,6	„	0,08	5,6	
20/XI	17,2	„	0,10		
21/XI	„	„	0,08		
7/I	17,5	„	0,07		
2/II	17,2	„	0,07	5,5	
average			0,09	4,6	

EXPERIMENT II.

Now, in the second experiment I used the same dog with Pawlow pouch and after giving him the ordinary meal, I gave him 5 gm. of uric acid together with some meat. And then I collected the gastric juice in the same way. I found 0,23 mg% uric acid and 4,0 mg% allantoin.

In the next experiment, I injected 10 mg uric acid (Lithium urate) per kilo of body weight into the same dog with Pawlow pouch and then collected the gastric juice in the following five

hours and I divided this juice into two lots, namely, the one collected in the first 2 and one half hours and the other in the second 2 and one half hours. In the first lot there was the allantoin 12,5 mg% and in the second 18,2 mg%, an average of 15,4 mg%, while in both cases the uric acid was found only in traces. The next day, without any charge, I obtained the gastric juice only by feeding and examined it. I got 0,09 mg% in the first half and 0,05 mg% in the latter, an average of 0,07 mg% uric acid; and, as to the allantoin, I got such an increased quantity as 35,5 mg% in the former and 19,8 mg% in the latter, an average of 27,6 mg%. Again on the following day, I injected 30 mg uric acid per kilo of body weight, but the secretion was so scarce that I could not divide it into two parts. After getting only 40 cc. in five hours, I examined it and found 0,13 mg% of uric acid and 48,3 mg% of allantoin.

Dog with stomach pouch.

dat.	body weight (kg)	used G. juice (ccm)	\bar{U} in mg%	Allantoin in mg%	not.
9/XI	17,5	100		4,0	58 \bar{U} per os.
11/XI	"	28	0,23		
13/XI	"	100	trace		5gm nucleinic-acid per os.
	"	"		3,0	
5/III	18,3	100 (before)	trace	12,5	10 mg \bar{U} per kilo injection
		" (after)	"	18,2	
		average		15,4	
6/III	18,0	100 (before)	0,09	35,5	
		" (after)	0,05	19,8	
		average	0,07	27,6	
7/III	17,5	40	0,13	48,3	30 mg \bar{U} per kilo injection

EXPERIMENT III.

The explanation of the question about the nitrogen components of gastric juice is insufficient, especially in human gastric juice. Although the purin metabolism of man and animal may not always be similar, I expected from my experiment on dogs that I might attribute partly at least this obscure part of the nitrogen components of human gastric juice to uric acid and allantoin.

In this experiment, I obtained the human gastric juice before the morning meal with Rehfus stomach tube and then 0,2 mg in 300 cc. caffein solution or 15 cc. in 300 cc. Shoyu solution (or soya-sauce) instead of a test meal were injected through the stomach tube. Then I collected the gastric juice every twenty minutes for two hours and obtained 7 lots in all. As it was assumed that uric acid and allantoin may have some relation to free and total acidity and total chlorides, I tested them in addition to uric acid and allantoin respectively in these lots which had no bile colour. The acidity was determined by titration with $n/10$ -NaOH, dimenthyl-amino-azo-benzol and phenolphthelein being used as indicators to differentiate the free and the total acidity, while total chlorides were

Diagnosis: health.

hour	G. juice (ccm)	tot. acidity	H Cl acidity	Cl indegree	used G. juice (ccm)	\bar{U} in mg%	Allan- toin in mg%	not.
before	40	17°	4°	115°	12	0,95	17,89	Caffein solution as stimulant.
after 20'	333	20"	16"	53"	200	0,60	2,06	
40'	121	20"	14"	59"				
60'	35	60"	50"	108"	20	0,85	12,19	
80'	31	81"	74"	135"	18	trace	11,55	
100'	35	80"	60"					
120'	10	80"	60"					
average						0,80	10,92	

determined by Stefan Rusznick's method. I could prove and determine abundant uric acid and allantoin, but could not discover any relations between their quantity and the acidity of the juice.

Diagnosis: Gastric ulcer.

hour	G. juice (ccm)	tot. acidity	H Cl acidity	Cl in degree	used G. juice (ccm)	\bar{U} in mg%	Allan- toin in mg%	not.
before	25	75°	60°	148°	15	1,55	24,61	Japanese soyasauce as stimulant.
after 20'	65	40"	25"	151"	50	0'24	5,17	
40'	30	70"	55"	144"	20	0,44	23,70	
60'	28	75"	65"	132"	15	1,30	14,61	
80'	7	70"	60"	128"				
100'	43	75"	60"	135"	25	2,22	9,84	
120'	33	75"	65"	135"	20	2,03	12,45	
					average	1,30	16,73	

Diagnosis: Gastric ulcer.

hour	G. juice (ccm)	tot. acidity.	H Cl acidity	Cl in degree	used G. juice (ccm)	\bar{U} in mg%	Allan- toin in mg%	not.
before	40	90°	70°	131°	30	1,03	11,11	Caffein solution as stimulant.
after 20'	130	60"	55"	115"	88	0,33	3,20	
40'	33	95"	85"	115	25	0,78	13,69	
60'	27	85"	75"	128	15	0,85	18,72	
80'	35	95"	80"	132	25	1,33	15,44	
100'	30	85"	70"	129	20	1,53	15,36	
120'	45	85"	75"	138	30	1,02	8,77	
					average	0,98	12,33	

On uric acid and allantoin in gastric juice.

7

Diagnosis: Dilatation of the stomach & r. apex tubereulosis.

hour	G. juice (ccm)	tot. acidity	H Cl acidity	Cl in degree	used G. juice (ccm)	Ū in mg%	Allan- toin in mg%	not.
before	27	5°	0	88°	20	2,85	6,01	Japanese soyasauce as stimulant.
after 20'	22	45"	30°	115"	10	1,76	8,07	
40'	12	25"	13"	80"	30	1,41	4,15	
60'	22	25"	15"	110"				
80'	20	30"	15"	98"				
100'	5	10"	0"	64"	—	—	—	
120'	12	5"	0	82"				
					average	2,01	6,76	

Diagnosis: Heroinhabit.

hour	G. juice (ccm)	tot. acidity	H Cl acidity	Cl in degree	used G. juice (ccm)	U in mg%	Allan- toin in mg%	not.
before	60	45°	35°	118°	40	1,06	16,36	Japanese soyasauce as stimulant.
after 20'	68	22"	10"	192"	55	0,74	5,84	
40'	50	50"	35"	190"	35	0,81	19,42	
60'	30	60"	50"	123"	20	0,89	19,32	
80'	27	55"	45"	150"	18	1,28	20,29	
100'	10	60"	50"	150"	18	1,43	23,59	
120'	24	55"	40"	119"				
					average	1,04	17,47	

Next, I examined the relation between the non-protein nitrogen and uric acid and allantoin. The non-protein nitrogen was determined as follows. I took 2 cc. gastric juice and diluted

it with 10 cc. distilled water and mixed 7,5 cc. colloidal iron by stirring little by little and added 0,5 cc. 0,5% MgSO_4 solution in order to exclude the excessive iron. The nitrogen in 10 cc. of this filtrate was determined by the method of Kjeldahl. The results are as follows.

dat.	Diagnosis.	used G. juice (ccm)	G-N in mg%	R-N in mg%	Ū-N		Allantoin-N	
					mg%	to R-N%	mg%	to R-N%
15/XII	Pleuro-peritonitis	35	57,4	36,4	1,04	2,8	3,19	8,7
17/XII	health	24	53,2	39,0	0,34	0,8	4,53	11,5
22/XII	not clear	40	72,8	16,8	0,36	2,1	1,53	9,1
26/XII	Pavinal habit	30	47,6	47,6	1,62	3,4	—	—

DISCUSSION.

Now, the source of uric acid and allantoin can be divided into two; that is, exogenous and endogenous. The one arises from purin precursors which are taken as meals and the other is derived from tissue metabolism. Mares (1910) has said that when the physiological function of cells is active, the generation of the endogenous uric acid increases, especially in the alimentary tract, and moreover, that if the function of glands becomes more lively by the injection of pilocarpin, the excretion of uric acid also increases. Considering this fact, the uric acid and allantoin in the gastric juice can be defined as the local by-products generated along with other elementary secretions. But in the loaded experiment, though the quantity of uric acid does not change, allantoin, on the contrary, increases remarkably by the injection of uric acid and this condition continues for three days after the injection. This fact is very important in the study of purin metabolism. The reason why the uric acid which was injected disappears so rapidly

may be that some part of it at least turns into allantoin and is secreted also in the stomach. So, a part of the deficiencies of purine metabolism ought to be sought in the gastric juice.

As experiment III shows, uric acid and allantoin are found also in the human gastric juice. Up to this date, allantoin was found in a small quantity in the urine of man and scarcely seemed to be important in purine metabolism. But it must be very significant that such an abundance of allantoin is found in human gastric juice. If the quantity of gastric juice in a day is 1,5 litres, as Carlson said, the allantoin in the gastric juice may be a considerable quantity.

CONCLUSION.

1. Uric acid and allantoin are some of the components of the gastric juice of man and dog.

2. When the vein of the dog was charged with uric acid, the allantoin increased remarkably in the gastric juice.

REFERENCES.

- Brugsch (1922): *Klin. Wochenschr.* 1495, 1729.
Brugsch und Rother (1925): *Zeitschr. f. physiolog. Chem.* **143**, 48.
Cohnheim (1906): *Die Physiolog. der Verdauung u. Ernährung.*
Folin, O., Berglund, H. u. Derick, C. (1924): *The Journ. of Biolog. Chem.*, **40**, 361.
Harpuder (1923): *Zeitschr. f. d. ges. exp. Med.*, **32**, 379.
Inoue, K. (1929): *Nagasaki Igakkai Zassi*, **7**, 984 (Referat S. 51).
López Suárez (1913): *Biochem. Zeitschr.*, **56**, 167.
Mareš (1910): *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiolog.*, **134**, 59.
Scherk: *Klin. Wochenschr.*, Nr. 51, 2432(1927); Nr. 44, 2110(1928).
Steinitz, H.: *Klin. Wochenschr.*, Nr. 20, 949 (1927); Nr. 27, 1267(1928).
Sumida, S. und Hongo, Y. (1930): *Nagasaki Igakkai Zassi*, **8**, 918.
Tamaszewski (1923): *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiolog.*, **171**, 1.
Wiechowski: *Neubauer-Huppert: Analyse des Harns*, **2**, 1076.
Yoshimura, S. (1929): *Journ. of Biochem.*, **10**, 435.

ÜBER DIE WIRKUNG DER ANTIKOAGULANTEN AUF DIE SERUMFERMENTE UND DAS KOMPLEMENT.

VON

KANEO YANAGISAWA.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 19. November 1930)

Im Jahre 1918 ist von Howell und Holt ein in vitro, wie in vivo gerinnungshemmender Stoff beschrieben worden, den sie nach der Herkunft aus der Hundeleber als "Heparin" bezeichnet haben. Die Erforschung des Einflusses dieses Hemmungstoffes auf die verschiedenen Fermente im Blut sollte für die Probleme der Blutgerinnung von besonderer Wichtigkeit sein, um die Entstehung des Gerinnungsfermentes aus seiner Vorstufe, sowie die chemische Veränderung bei der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin zu verfolgen. Zu nachstehenden Experimenten wurde das nach meinem eigenen Verfahren dargestellte "Heparin"-Präparat angewendet; über die Einzelheiten dieser Verfahren wird weiter unter berichtet. Zunächst habe ich, meist bei Meerschweinchenserum, die Wirkung des Heparins auf Butyrase, Lezithase, kephalinspaltendes Ferment, Glycerophosphatase, Tryptase, Peptase, Nuklease, Amylase und glykolytisches Ferment untersucht. Die Experimente ergaben aber, dass die Fermentwirkungen durch Heparin keinen beeinträchtigenden Einfluss erlitten haben, ausgenommen Glycerophosphatase und Lezithase, auf welche das Heparin einen ganz geringen befördernden Einfluss ausgeübt hat. Waldschmidt-Leitz (1929) geben an, das Heparin (Howell) verhindere die Trypsinwirkung; unter meinen Versuchsbedingungen habe ich leider keinen Beweis dafür gefunden. Mein Heparin beschränkt seine hemmende Wirkung nur auf die Blutgerinnung.

In weiteren Experimenten mittels Fibrinogens, Thrombins und Prothrombins, welche nach den bei uns üblichen Vorschriften verarbeitet wurden, und deren Einzelheiten in einer späteren Veröffentlichung besprochen werden sollen, hat das Heparin eine deutliche Hemmung bewirkt. Es hemmte schon in 0,0165% Endkonzentration sowohl Fibrinogen-Thrombinwirkung, als auch Fibrinogen-Prothrombin-Ca-Kephalinwirkung. Wenn Oxalatplasma an Stelle des Fibrinogens angewendet wurde, konnte ich auch das Ausbleiben der Thrombinwirkung feststellen.

Horino (1928) hat im hiesigen Institut das Adsorptionsverhalten des Hämolysins und des Komplements untersucht und hat dabei eine innige Beziehung zwischen Komplementmittelstück und Thrombin gefunden. Fuchs und Falkenhausen (1927) haben andererseits die Verspätung der Blutgerinnung nach der Injektion der sensibilisierten Erythrocyten beobachtet und haben den Schluss gezogen, dass das Komplement eine Rolle bei der Blutgerinnung spielt. Die Identizität der Wirkung des Prothrombins mit dem Komplementmittelstück wurde von Fuchs und seinen Mitarbeitern (1928) auf verschiedenen Wegen gefunden und veröffentlicht. Es ist also interessant, zu untersuchen, welchen Einfluss Heparin und Novirudin, die die Wirkung des Thrombins hemmen und leicht darzustellen sind, auf die spezifische Hämolyse ausüben. Fuchs und Hartmann (1928) haben schon die anti-komplementäre Eigenschaft des Heparins, Hirudins und Novirudins angegeben. Dieser Befund wurde aber von Ecker und Gross (1929) in anderem Sinne gedeutet, d.h. Heparin hemmt die Wirkung der dritten Komponente des Komplements. Um dieses Verhalten noch genauer zu erforschen, habe ich nachstehende Versuche unternommen.

Das Novirudin ist ein Hemmungsstoff, der, auf Grund der Adler und Wiechowski'schen Forschung (1922) hergestellt, käuflich ist. 10 mg Novirudin genügen, um 5 ccm Kaninchenblut dauernd flüssig zu halten, d. h. für die vollkommene Aufhebung der Gerinnbarkeit ist 0,2% Endkonzentration erforderlich. Da

Novirudin von einheitlicher Herkunft zum Experiment gebraucht werden sollte, habe ich Novirudin aus Tyrosin nach der Angabe von Adler dargestellt; seine Hemmungskraft ist gleich der des Handelspräparates. In den nachstehenden Untersuchungen wurde dieses Tyrosin-Schwarz-Natrium gebraucht und es wird einfachheitshalber als Novirudin bezeichnet. Im Vergleich mit Heparin ist bei Novirudin eine mehr als 5 fach grössere Hemmungsdose erforderlich. Aber wenn man in Betracht zieht, dass das Novirudin im Gegensatz zum Heparin mit Ca-Ion einen wasserschwerlöslichen Niederschlag bildet, kann die Wirksamkeit des Novirudins gegen das Fibrinogen-Thrombinsystem nicht ohne weiteres aus der erforderlichen Dose gegen Blut an sich ermittelt und mit der des Heparins verglichen werden. Das Novirudin wies, vorher in Fibrinogenlösung gemischt, schon in 0,008% Endkonzentration vollkommene Verhinderung der Gerinnung bei Thrombinzusatz auf.

Zunächst wurde der Einfluss des Heparins auf das hämolytische System untersucht. Das durch Einspritzung von Ziegenblut gewonnene Immunserum des Kaninchens löst Ziegenblut bei Gegenwart von Meerschweinchenserum, und zwar geht dabei der hämolytische Prozess mit derselben Geschwindigkeit vor sich, unabhängig von der Anwesenheit des Heparins. Das gilt weiter bei Versuchen sowohl mit konstanter Heparin- und wechselnder Hämolysinmenge, als auch mit wechselnder Heparin- und konstanter Hämolysinmenge. Dieses Ergebnis spricht gegen die Angabe von Fuchs und Hartmann (1928), und die Nichtübereinstimmung rührt vielleicht von der Art der angewandten Komplementlösung her. Die genannten Autoren haben als Komplement Menschenserum gebraucht, ich aber, wie oben erwähnt, Meerschweinchenserum. Nach Ecker und Gross kann die Hemmung bei Hämolyse durch Heparin nur bei sehr verdünnter Komplementlösung beobachtet werden. Das Ausbleiben der Heparinwirkung bei der spezifischen Hämolyse führte mich zu dem folgenden Versuch, dessen Resultat sehr bemerkenswert war.

Bekanntlich erweist sich das durch Injektion von Ziegenery-

throcyten an Kaninchen erzeugte Hämolysin als ein Gemisch von zweierlei Hämolysinen, nämlich einem durch thermolabiles Protein-Antigen der Erythrocytenbestandteile bedingten und einem durch thermostabiles Lipoid-Antigen bedingten. Bei dem hämolytischen Vorgang wirken die Hämolysine auf ihre Antigene ein, d. h. ein Antigen verbindet sich nur mit dem ihm entsprechenden Antikörper. So müsste die Hämolyse bei der Antiziegenbluthämolysinanwendung auf folgende Weise stattfinden. Erstens wirkt das proteinogene Hämolysin zunächst auf den Eiweissrezeptor der Erythrocyten, und dann reagiert darauf das Thrombin im Meer-schweinchenserum. Zweitens wird das lipidogene Hämolysin vom Lipoid-Antigen der Erythrocyten gebunden, und dann bewirkt eine bestimmte wirksame Substanz im Serum die Hämolyse. Daraus lässt sich die Erwägung ableiten, dass das Heparin zwar bei der Hämolyse proteinogener Natur, wobei Thrombin mitspielt, die hemmende Wirkung aufweise, aber nicht bei der Hämolyse lipidogener Natur. Das Ausbleiben der erwarteten Heparinwirkung am genannten hämolytischen System dürfte also durch Ueberwiegen des lipidogenen Anteils bedingt sein. Ich möchte hier sagen, dass die Thrombinwirkung bei dem Hämolysenvorgang nicht eine physikalische Zustandsveränderung bei der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin, sondern eine noch unklare, dabei stattfindende chemische Reaktion bedeutet.

Jedenfalls hat mich der vorstehende Gedankengang zu weiteren Untersuchungen geführt, um die Einwirkung von Heparin auf die einzelnen Wirkungen des proteinogenen und lipidogenen Hämolysins auseinanderzusetzen.

Das lipidogene Hämolysin H(L) wurde durch Injektion von Alkoholextrakt der Ziegenerythrocyten mit Zusatz von Schweineserum als Schlepper erhalten. Das proteinogene Hämolysin H(P) wurde durch intraperitoneale Einverleibung des Rückstands nach Alkoholextraktion der Ziegenerythrocyten erhalten. Da es fraglich ist, ob sich durch Alkoholbehandlung der Erythrocyten die Beseitigung des Lipoides genügend ermöglichen lässt, wurde das

so erhaltene proteinogene Hämolysin weiter mit gekochten Erythrocyten behandelt, um vielleicht gemischt vorhandenes lipoidogenes Hämolysin möglichst zu beseitigen. Mittelst der so erhaltenen beiden Hämolysine H(L) und H(P) habe ich die Heparinwirkung geprüft. Das Heparin wirkte auf proteinogenes Hämolysin hemmend, auf das lipoidogene dagegen nicht. Eine noch stärkere hemmende Wirkung zeigte Heparin bei Anwendung des proteinogenen Hämolysins, das durch intraperitoneale Injektion des Rückstandes nach der Alkoholäthergemischextraktion an Kaninchen erzeugt wurde.

Im Anschluss an die auffallenden Befunde bei Heparin habe ich Versuche über die Einwirkung des Novirudins auf das hämolytische System angestellt. Dazu bediente ich mich eines Präparates, das aus Tyrosin hergestellt wurde. Das Novirudin hemmte vollkommen die lösende Wirkung jenes Komplexhämolysins, welches nach Injektion von Ziegenblut an Kaninchen gewonnen wurde. Wie oben erwähnt, wurde bei Heparin keine Hemmung der Hämolyse durch dieses Komplexhämolysin beobachtet. Es besteht also ein ausgesprochener Unterschied zwischen der Wirkung des Heparins und Novirudins. Die analytische Untersuchung mit dem genannten Hämolysin ergab, dass das Novirudin auf proteinogenes wie auf lipoidogenes Hämolysin hemmend einwirkt.

Die Hemmungsfähigkeit auf lipoidogenes Hämolysin scheint im wesentlichen die Ursache zu sein, die beim Einwirken des Heparins und des Novirudins auf das Mischhämolysin das nicht übereinstimmende Resultat der hemmenden Wirkung mit sich bringt.

In weiteren Versuchen habe ich Folgendes beobachtet: Wenn im hämolytischen System statt des Meerschweinchenserums auch das Oxalatplasma als Komplement verwendet wurde, zeigte das proteinogene Hämolysin H(P) gleichartig lösende Wirkung. Wurde das Oxalatplasma dagegen zusammen mit dem lipoidogenen Hämolysin H(L) verwendet, trat die Hemmung der Hämolyse auf. Das bedeutet, dass das in jenem kalkarmen Oxalatplasma enthaltene

Prothrombin auf das Eiweissantigen der Erythrocyten, welches durch Bindung des Hämolytins in einen gewissen Zustand geleitet ist, den gleichen Angriff wie das Thrombin ausübt. Warum das Novirudin, im Gegensatz zu Heparin, das lipidogene Hämolytin hemmend beeinflusst, ist noch späterem Studium festzustellen vorbehalten. Es hemmt zumindest nicht die Butyrase und die Lecithase des Serums. Novirudin hat aber, wie schon erwähnt, Ca-fällende Fähigkeit. Wenn das Resultat bei Oxalatplasma in Erwägung gezogen wird, müsste die Entionisierung des Kalkes durch Novirudin also wenigstens als eine Ursache der Hemmung bei lipidogenem Hämolytin zu betrachten sein, während die Bedeutung des Ca-Ions für Komplementwirkung bisher oft bestritten wurde. Gleichzeitig zeigt es sich, dass die Kalkwirkung für das proteinogene Hämolytin zu unbedeutend ist, um Hämolyse hervorzurufen.

Weiter unternahm ich folgende Experimente: Meerschweinchen Serum wurde nach Liefmanns Methode durch CO₂-Durchleitung in Globulin- und Albuminfraktion zerlegt. Nach 2 maligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Globulinfraktion 10 fach wie das Anfangsvolumen des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, während die Albuminfraktion, nach Isotonisierung mit 10% Kochsalzlösung, auf das 10 fache Volumen der Anfangsserummenge mit physiologischer Kochsalzlösung ergänzt wurde. Diese verdünnte Globulin- sowie Albuminfraktion wurden hierauf mit Heparin versetzt, dann in eine Mischung vereinigt und als Komplement auf Komplexhämolytin + Blutzellen geprüft. An diesem System verhinderte das Heparin den Hämolyseprozess auffallend.

Das Ergebnis spricht zwar scheinbar gegen die Tatsache, dass Heparin, wie schon erwähnt, im Gegensatz zu Novirudin auf die Wirkung des Komplexhämolytins keinen hemmenden Einfluss ausübt. Aber durch die weiteren Versuche wurde festgestellt, dass, als die beiden auf solche Weise zerlegten Fraktionen des Meerschweinchen Serums, ohne mit Heparin versetzt zu werden, wieder

zusammengebracht wurden, diese Mischung nun bei dem Hämolsin proteinogener Natur ebenso kräftig komplettierend wie das native Meerschweinchenserum von gleicher Verdünnung wirkte, aber bei dem Hämolsin lipidogener Natur eine nur ganz schwache komplementäre Wirkung entfaltete. Solche Abweichung müsste wohl darauf beruhen, dass die Manipulation, d. h. Fraktionieren des Serums und 2 maliges Waschen der Globulinfraction, den vermutlichen Schwund einer gewissen für die Komplementierung des lipidogenen Hämolsins notwendigen Fraktion des Serums veranlasst. Mit solcher Komplementlösung war die Hemmung der Hämolyse durch das Heparin wohl zu erwarten, die ja auch eintrat. Man sieht also hier keinen Widerspruch, sondern eine Bestätigung der oben erwähnten Annahme über die Wirkung des Heparins bei der spezifischen Hämolyse.

Jedenfalls ist es interessant, dass das Heparin nur die Hämolyse durch Protein-Antigen hemmt, während das Novirudin die durch Protein-, wie Lipoid-Antigen beeinträchtigt. Mit diesem Ergebnis glaube ich zu dem Studium des Verhaltens zwischen Komplementwirkung und Thrombin etwas beigetragen zu haben.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DES HEPARINS.

Die Leber eines aus der A. carotis entbluteten Hundes wurde nach Howells Angabe von der Pfortader aus mit 1% Kochsalzlösung durchspült, um sie möglichst blutfrei zu waschen. Sie wurde dann in Stücke geschnitten mit der Maschine zerhackt, im Mörser zerrieben, auf Platten ausgestrichen und bei 65°C getrocknet. Das trockene Material wurde fein pulverisiert. So wurden etwa 1000 g trockener Substanz aus über 10 Hundelebern gewonnen. Je 50 g davon wurden bei jedem der nachstehenden Darstellungsversuche gebraucht.

Zunächst wurden 50 g Leberpulver mit 500 ccm 1% Kochsalzlösung bei alkalischer Reaktion durch Ammoniakzusatz 15 Minuten

extrahiert und filtriert. Beim Versuch, das Filtrat durch Fällung mit Bleizucker und mit Bleiessig zu fraktionieren, wurde festgestellt, dass der Niederschlag, welcher durch die dem Bleizuckerzusatz vorangehende Ansäuerung mit Essigsäure ausgefällt wurde, eine gerinnungshemmende Substanz einschloss, die Bleizucker- und Bleiessigfraktion dagegen nicht. Deshalb wurde im nächsten Falle der ammoniakalische Extrakt von Leberpulver mit Essigsäure neutralisiert und dann durch Kochen enteiweisst. Aus diesem Eiweisskoagulum konnte durch ammoniakalische Extraktion keine Hemmungssubstanz nachgewiesen werden. Die enteiweisste Lösung wurde nach Erkalten mit Essigsäure solange angesäuert, als noch weisslicher, flockiger Niederschlag ausfiel. Die Fällung wurde durch Filtration getrennt. Das Filtrat wurde neutralisiert und mit dem gleichen Volum Aceton versetzt. Die dabei ausgefällte Fraktion zeigte aber nur ganz schwache hemmende Wirkung. Nun wurde jener durch Essigsäurezusatz ausgefällte Niederschlag in Wasser aufgenommen und durch Neutralisierung mit Natronlauge in Lösung gebracht. Hierauf wurde diese auf dem Wasserbad abgedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und filtriert. Endlich wurde das Filtrat wieder abgedampft, der trockene Rückstand pulverisiert. Dieses Präparat ist wasserlöslich und hat gerinnungshemmende Kraft, und zwar verhindert 0,5 mg in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung die Gerinnung von 5 ccm Kaninchenblut vollständig über 24 Stunden. Zwecks der Reinigung dieses Präparates behandelte ich weiter seine wässrige Lösung mit Bleiessig bei ammoniakalischer Reaktion. Der Niederschlag, ebenso auch das Filtrat, wurde mit Ammoniumsulfid entbleit, dann neutralisiert und abgedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und mit gleichem Volumen Aceton gefällt. Der Niederschlag wurde nun auf seine Hemmungskraft geprüft. Derjenige, welcher aus der mit Bleiessig fällbaren Fraktion stammte, erwies sich als gerinnungshemmend, sodass 0,5 mg die Gerinnbarkeit von 5 ccm Kaninchenblut völlig aufhob. Die Wirksamkeit war also durch die Bleifällung nicht besonders verstärkt. Das aus der durch Bleiessig nicht fällbaren

Fraktion herstammende Material war wirkungslos. Daraus ist ersichtlich, dass Heparin mit Essigsäure ausfällbar ist. In einem anderen Falle beobachtete man, dass auch der durch Salzsäureansäuerung entstandene Niederschlag eine Hemmungssubstanz mit derselben Aktivität lieferte.

In einem weiteren Fall versuchte ich die Essigsäurefällung unter geändertem Adsorptionsverhältnis des Mediums durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung durch Oktylalkoholzusatz. Der wirksame Bestandteil liess sich auch diesmal, gerade wie zuvor, im Essigsäureniederschlag zeigen.

Als man die wässrige Lösung des Heparins bei neutraler Reaktion mit Tierkohle behandelte, erwies sich das Filtrat als hemmungsunwirksam, und auch als diese Tierkohle sodann mit verdünntem Ammoniakwasser eluiert wurde, war keine wirksame Substanz in dem Elut zu konstatieren. Wurde aber das Heparin in verdünntem Ammoniakwasser aufgelöst und mit Tierkohle behandelt, so zeigte sich die Adsorptionsrestlösung nach dem Trocknen als hemmungswirksam. Sie zeigte aber keine dem vorigen Präparat an Aktivität (0,5mg für 5ccm Blut) überlegene Wirkung.

In anderem Verfahren wurde das Leberpulver mit Alkoholäther unter Rückflusskühler möglichst von fettiger Substanz befreit. Dann wurde der Extraktionsrückstand mit 1% Kochsalzlösung und Essigsäure digeriert und filtriert. Der Rückstand wurde mit ammoniakalischer 1% Kochsalzlösung extrahiert, das Extrakt mit Essigsäure gefällt, die Fällung in Wasser aufgeschwemmt, durch Neutralisierung mit Natronlauge in Lösung gebracht und dann filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbad abgedampft, der Rückstand pulverisiert. Dieses Präparat zeigte auch die gleiche Hemmungskraft, wie das vorige. Ein ähnliches Verfahren, wobei Benzol anstatt des Alkoholäthers benützt wurde, hatte das gleiche Resultat zur Folge. Bei der Prüfung der wässrigen Lösung des Heparins ergibt sich Folgendes: Ninhydrin- und Biuretreaktion negativ, Reduktionsprobe vor und nach dem Kochen mit Salzsäurezusatz negativ, Bleisulfidprobe negativ. Auf Bariumchloridzusatz

nach Kochen mit Salzsäure keine Trübung; ebenso bewirkt, nach dem Veraschen mit Salpetersäure und dem Lösen in verdünnter Salzsäure, auch Calciumchlorid keine Trübung.

Brüda (1928) berichtete, dass er nach Howells Darstellungsmethode aus Witte-Pepton eine dem Heparin ähnliche gerinnungshemmende Substanz darstellte. Jedoch gelang es mir weder nach Howells Methode, noch nach meiner Fällungsmethode eine aktive Substanz aus Witte-Pepton herzustellen. Es sei hier noch beigelegt, dass die nach Levene (1925) aus Schweineblut hergestellte Mukoitin-Schwefelsäure keine gerinnungshemmende Wirkung hat.

II. DARSTELLUNG VON TYROSIN-SCHWARZ-NATRIUM.

Die Methode von Adler (1922) wurde ein wenig modifiziert. 5 g Tyrosin wurden in 250 ccm Wasser aufgeschwemmt und mit 60 ccm n-FeCl₃ und 55 ccm 3% H₂O₂ versetzt. Das Gewisch wurde unter Umrühren langsam erwärmt, bis sich der eingetretene dunkle Farbton nicht mehr vertiefte. Auf nachträgliches Erhitzen wurde der schwarze Niederschlag grosskörnig und der ungelöst gebliebene Tyrosinüberschuss aufgelöst. Der Niederschlag wurde auf Heiss-trichter gesammelt, mit 150 ccm 4n-Natronlauge aufgelöst und dann mit 6 fachem Volumen Alkohol versetzt. Nach 12 stündigem Stehen wurde der schwarze Bodensatz sorgfältig aufgesammelt, mit Alkohol alkalifrei gewaschen und getrocknet. Dieses Material hat ähnliche hemmende Kraft wie das Handelspräparat Novirudin (2 mg für 1 ccm Blut).

Das Material wurde weiter in Wasser gelöst und mit Salzsäure gefällt. Der Niederschlag wurde gesammelt, in Wasser aufgenommen, durch Natronlaugezusatz in Lösung gebracht, und dieses Verfahren nochmals wiederholt. Schliesslich wurde der Salzsäureniederschlag mit Wasser gewaschen, mit Natronlauge neutralisiert und sodann getrocknet. Das Präparat zeigt stärkere Hemmungswirkung (0,7 mg für 1 ccm Blut).

III. EINFLUSS DES HEPARINS AUF DIE FERMENTE DES MEERSCHWEINCHENSERUMS.

1. Butyrase.

Methodik: Stalagometrische Bestimmung nach Rona und Michaelis.
Tropfpipette: bei Wasser 89 Tropfen.

Gesättigte wässrige Tributyrinlösung	50 cem	} 37°C
Phosphatgemisch (M/3 KH_2PO_4 1 T : M/3 K_2HPO_4 4 T)	2 cem	
Meerschweinchenserum, mit 0,85% NaCl-Lösung	2 cem	
10 fach verdünnt.	2 cem	
Heparin in 0,85% NaCl-Lösung (1 mg pro 1 cem)	2 cem	

	· sofort	nach 1 Stunde	Differenz
mit Heparin	125 Tropfen	99 Tropfen	26 Torpfen
ohne Heparin	125 „	99 „	26 „

2. Lezithase.

Das benützte Lezithin-Präparat wurde im hiesigen Institut nach Levene (1927) aus Eigelb dargestellt.

0,5% Lezithinsuspension in 0,85% NaCl-Lösung	5 cem	} 37°C
Phosphatgemisch (M/10 NaH_2PO_4 4 T : M/10 Na_2HPO_4 6 T)	1 cem	
Meerschweinchenserum (1:10)	4 cem	
0,85% NaCl-Lösung	1 cem	

Bei dem Hauptversuch wurde 1 mg Heparin vorher mit 1 cem NaCl-Lösung versetzt. Die Aziditätszunahme wurde nach Zusatz von 11 cem Alkohol titrimetrisch mit 50% alkoholischer 0,1 n-Kalilauge geprüft.

	sofort	nach 18 Stunden	nach 42 Stunden
mit Heparin	0,68 cem	1,25 cem	1,55 cem
ohne Heparin	0,67 „	0,95 „	1,23 „

3. *Kephalinspaltendes Ferment.*

Das ganze Verfahren wurde ähnlich wie bei dem Lezithasenversuch durchgeführt. Als Substrat diente 0,5% Kephalinsuspension in physiologischer Kochsalzlösung.

	sofort	nach 18 Stunden	nach 42 Stunden
mit Heparin	0,68 cem	0,77 cem	0,97 cem
ohne Heparin	0,68 „	0,70 cem	0,85 „

4. *Glycerophosphatase.*

Als Substrat diente M/100 Natriumglycerophosphatlösung.
Die Versuchsanordnung:

I	Natriumglycerophosphatlösung	10 cem
	Meerschweinchenserum (1:10)	10 cem
	Heparinlösung (1 mg pro 1 cem)	1 cem
II	Natriumglycerophosphatlösung	10 cem
	Meerschweinchenserum (1:10)	10 cem
	0,85% NaCl-Lösung	1 cem
III	Natriumglycerophosphatlösung	10 cem
	Meerschweinchenserum (1:10)	10 cem
	Heparinlösung (1 mg pro 1 cem)	1 cem
	M/10 Glykokoll-Natriumgepuffer (pH=9,0)	1 cem
IV	Natriumglycerophosphatlösung	10 cem
	Meerschweinchenserum (1:10)	10 cem
	0,85% NaCl-Lösung	1 cem
	M/10 Glykokoll-Natronlaugepuffer	1 cem

Die Lösungen wurden im Brutschrank bei 37°C gehalten. Nach Bedarf wurden 2 ccm von jeder Lösung abpipettiert und nach H. Fiske und J. Subbarow colorimetrisch geprüft.

	P-Zunahme nach 18 Stunden
I	0,0223 mg
II	0,0154 „
III	0,0209 „
IV	0,0192 „

An vorigen Versuch anschliessend wurde folgender Versuch unternommen:

		P-Zunahme nach 18 Stdn.
I	Natr. Glyceroph.-Lös. 10 ccm	0,02237 mg
	Serum 10 ccm	
	Heparinlösung 1 ccm	
II	Natr. Glyceroph.-Lös. 10 ccm	0,01285 mg
	Serum 10 ccm	
	0,85% NaCl-Lösung 1 ccm	
III	0,85% NaCl-Lösung 10 ccm	(—)
	Serum 10 ccm	
	Heparinlösung 1 ccm	
IV	Serum 10 ccm	(—)
	0,85% NaCl-Lösung 11 ccm	

5. *Tryptase*.

Als Substrat diente Kongorot-Eiweisskoagulum. (Darstellungsmethode, s. Horino(1928)).

- 1) 10 ccm Meerschweinchenserum (1:10) wurde mit 1 mg Heparin versetzt.

2) Serum ohne Heparinzusatz.

Zwei Reihen von Reagenzgläsern für 1) und 2) wurden von 2 ccm an in absteigender Reihe verdünnt angeordnet. Jedes wurde mit einer kleinen Menge von Kongorot-Eiweisskoagulum versetzt und im Brutschrank bei 37°C 2 Stunden lang gehalten. Die Verfärbung der obenstehenden Flüssigkeit ging in beiden Reihen ganz parallel.

6. *Peptase.*

1 g Witte-Pepton wurde in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

I. Hauptversuch:

Peptonlösung	10 ccm	} 37°C
Serum (1:10)	10 „	
Heparinlösung (1 mg pro ccm)	1 „	

II. Kontrollversuch:

Peptonlösung	10 ccm	} 37°C
Serum (1:10)	10 „	
0,85% NaCl-Lösung	1 „	

Für die Untersuchung wurden davon 5 ccm herauspipettiert, mit 95 ccm Alkohol versetzt und mit 90% alkoholischer 0,2 n-Kalilauge gegen Thymolphthalein titriert.

	sofort	nach 5 Stunden	nach 45 Stunden
I	0,3 ccm	0,51 ccm	0,73 ccm
II	0,3 ccm	0,50 ccm	0,72 ccm

7. *Nuklease.*

Untersuchung nach Pighini'scher Methode. Als Substrat wurde 1,6% Lösung von Natriumnukleinat (Merck) in 0,85% Kochsalzlösung vorbereitet. Die nachstehenden Versuchsmischun-

gen wurden in 37°C gehalten. Mittels Landoltschen Polarisationsapparates wurde die Drehungsveränderung verfolgt. Länge des Rohres 1 dm.

		sofort	n. 2 Std.	n. 4 Std.
Natriumnukleinatlösung	50 ccm			
Serum (1:10)	2 „	+1,92	+1,70	+1,57
Heparinlösung (1mg pro ccm)	1 „			
Natriumnukleinatlösung	50 ccm			
Serum (1:10)	2 „	+1,93	+1,73	+1,58
0,85% NaCl-Lösung	1 „			

8. *Amylase.*

Nach Wohlgemuth untersucht. 1% Stärkelösung wurde mit 0,85% Kochsalzlösung 2 fach verdünnt.

Versuchsanordnung: 10 ccm Serum (1:10) wurden mit 1 mg Heparin versetzt und in geometrischer Reihe mit 0,85% Kochsalzlösung verdünnt. Je 2 ccm dienten zum Versuch. Als Kontrolle dasselbe Serum ohne Heparin. 5 ccm Stärkelösung wurden in jedes Reagenzglas zugesetzt. Nach 24 Stunden langem Stehen im Brutschrank bei 37°C wurde durch Einträufelung die Dextrinbildung mit 1/10 n-Jodlösung geprüft.

Verdünnungs- grad	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
mit Heparin	+	+	+	±	±	±	—
ohne Heparin	+	+	+	±	±	±	—

+ braun, ± bläulichbraun, — Blau.

9. *Glykolytisches Ferment.*

Vorbereitung:

- 1) Als Substrat diene 1% Traubenzuckerlösung in 0,85% Kochsalzlösung.

- 2) Heparinplasma (HP) wurde nach Zentrifugieren von 10 ccm Kaninchenblut herauspipettiert, welches durch Zusatz von 4 mg Heparin flüssig blieb. Die dabei angesammelten Erythrocyten wurden nach wiederholtem Waschen auf die Anfangsmenge mit physiologischer Kochsalzlösung ergänzt. (HE).
- 3) Von 10 ccm defibriniertem Kaninchenblut wurden in ähnlicher Weise Serum (S) und Erythrocyten (E) gewonnen.

Die Versuchsmischungen, die unten tabellarisch angegeben sind, wurden im Brutschrank bei 37°C stehen gelassen. Die Zuckermenge wurde nach Hagedorn'scher Methode bestimmt.

	Glukose	HP	HE	S	E	Glukosegehalt(%)	
						sofort	n. 2 Std.
I	1 ccm	2 ccm	2 ccm	—	—	0,21	0,19
II	1 „	2 „	—	—	2 ccm	0,22	0,19
III	1 „	—	2 ccm	2 ccm	—	0,23	0,20
VI	1 „	—	—	2 „	2 ccm	0,23	0,20

IV. DARSTELLUNG DER HÄMOLYTISCHEN AMBOZEPTOREN

Die in den nachstehenden Experimenten gebrauchten Hämolyse wurden in folgender Weise dargestellt. Die Ermittlung ihrer hämolytischen Titer wird zusammen in Tabelle A angegeben.

1) *Komplexhämolysin.*

Die Ziegenerythrocyten wurden wiederholt mit 0,85% Kochsalzlösung gewaschen und dann mit derselben Kochsalzlösung auf die Anfangsblutmenge ergänzt. Je 5 ccm davon wurden Kaninchen in die Ohrvene jeden 2. Tag einmal, im Ganzen 3 mal injiziert. 7 Tage nach letzter Injektion Blutentnahme. Carbolzusatz 0,5%ig. Bezeichnung: H. Hämolytisches Titer: 1000.

2) *Proteinogenes Hämolsin.*

- a) Aus 50 ccm defibriniertem Ziegenblut gewonnene Erythrocyten wurden mit physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gewaschen, dann durch Zusatz mit 50 ccm destillierten Wassers hämolysiert und mit 300 ccm Alkohol extrahiert. (Das Extrakt dient zur Erzeugung lipoidogenen Hämolsins, s.u.). Der Extraktionsrückstand wurde mit 95% Alkohol, dann mit Aether gewaschen, getrocknet und fein pulverisiert. Diese Trockensubstanz (6,5 g) wurde in 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, je 5 ccm davon in Kaninchen intraperitonéal jedem 2. Tag einmal, im Ganzen 3 mal injiziert. Blutentnahme und dgl. wie vorher. Bezeichnung: H(P). Hämolytisches Titer: 1000.
 - b) An Stelle der Alkoholextraktion in vorstehender Methode wurde die Alkoholätherextraktion angewandt. Weiteres Verfahren war ganz dasselbe. Bezeichnung: H'(P). Hämolytisches Titer: 200.
 - c) 1 ccm gut gewaschener Ziegenerythrocyten wurde in siedendem Wasserbad 2 Stunden erhitzt, darauf mit 5 ccm H(P) versetzt. Zentrifugierung nach 30 Minuten. Die Adsorptionsrestlösung wird H''(P) bezeichnet. Hämolytisches Titer: 800.
- 3) Das oben beschriebene alkoholische Extrakt von Ziegenblut wurde abgedampft, der Rückstand in 50 ccm 0,85% Kochsalzlösung aufgenommen und sodann zentrifugiert, und ergab eine gelblichgrüne Flüssigkeit. 5 ccm derselben wurden mit 5 ccm von 5 fach verdünntem Schweineserum versetzt und Kaninchen intravenös injiziert. 3 mal Injektionen wie vorher. Das so gewonnene Hämolsin wird H(L) bezeichnet. Hämolytisches Titer: 200.

Bei der Anstellung des hämolytischen Versuches wurde je 1 ccm 5% Ziegenerythrocytensuspension, Hämolsin und Meer-schweinchenserum (1:10) als Komplement gemischt und 2 Stunden in den Brutschrank (37°C) gestellt. Der Grad der Hämolysen wird wie üblich mit \sharp , $\#$, $+$, und \pm bezeichnet. In den nachstehenden Versuchen wurde überall je 1 ccm Zellsuspension, Hämolsin und

Komplement angewendet. Einfachheitshalber wird in den nachstehenden Tabellen meist auf die Angabe der Menge der einzelnen Bestandteile des hämolytischen Systems verzichtet.

TABELLE A.

Verdünnung Hämolysin	1/50	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1000	1/1500	1/3000	1/6000
H	##	##	##	##	##	##	##	+	+	±
H (P)	##	##	##	##	##	##	##	+	+	±
H' (P)	##	##	##	+	+	±	±	—	—	—
H'' (P)	##	##	##	##	##	##	+	±	±	—
H (L)	##	##	##	+	+	±	±	—	—	—

In den folgenden Versuchen 1, 2 und 3 wurde die Prüfung des Einflusses von Heparin auf die Komplexhämolysinfunktion und die Bedeutung des Heparinplasmas als Komplement vorgenommen.

Versuch 1.

Hämolysin: Komplexhämolysin H in Verdünnung 1/100, in absteigender Reihe verdünnt.

Blutzellen: 5% Ziegenerythrocytensuspension.

Komplement: 1) 5 ccm Meerschweinchenblut werden mit 3 mg Heparin in 1 ccm 0,85% NaCl-Lösung versetzt, zentrifugiert. Erhaltenes Plasma, mit 0,85% NaCl-Lösung 10 fach verdünnt, dient als Komplement. (HP).

2) 10 ccm Meerschweichenserum (1:10) + 10 mg Heparin. (SH).

3) Meerschweinchenserum (1:10). (S).

I. Hämolysin 1 ccm + Erythrocyten 1 ccm + HP 1 ccm	} 37°C 2 Std.
II. Hämolysin 1 ccm + Erythrocyten 1 ccm + SH 1 ccm	
III. Hämolysin 1 ccm + Erythrocyten 1 ccm + S 1 ccm	

TABELLE I.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnung d. Hämolysins										
Komplement	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200
I HP	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	±	±	—	—
II SP	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	±	±	—	—
III S	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	±	±	—	—

Versuch 2.

Hämolysin: wie zuvor

Blutzellen: ebenso

Komplement: 1) 10 mg Heparin in 5 ccm 0,85% NaCl-Lösung werden in das Meerschweinchenherz injiziert. Blutentnahme nach 5 Minuten. Zentrifugierung. Das Plasma (HP) 10 fach und 20 fach verdünnt als Komplement benützt.

2) Als Kontrolle, 10 fach und 20 fach verdünntes Meerschweinchenserum. (S).

I. Hämolysin 1 ccm + Erythrocyten 1 ccm + HP (1:10) 1 ccm	$\left. \begin{array}{l} 37^{\circ}\text{C} \\ 2 \text{ St.} \end{array} \right\}$
II. „ „ „ + „ „ „ + S (1:10) 1 „	
IV. „ „ „ + „ „ „ + S (1:20) 1 „	
III. „ „ „ + „ „ „ + HP (1:20) 1 „	

Versuch 3.

Hämolysin: wie zuvor

Blutzellen: ebenso

Komplement: 1) 5 ccm Meerschweinchenblut + 3 mg Heparin in 1 ccm 0,85% NaCl-Lösung. Erhaltenes Plasma 10 fach verdünnt. (HP).

2) 1 ccm Meerschweinchenblut + 1 mg Heparin in
9 ccm 20,85% NaCl-Lösung. Zentrifugierung.
(HP').

3) Meerschweinchenserum (1:10). (S).

I. Hämolysin 1 ccm + Erythrocyten 1 ccm + HP 1 ccm }
II. " " " + " " " + HP' " " } 37°C 2 Std.
III. " " " + " " " + S " " }

TABELLE II.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Verdünnung d. Hämolysins	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600
Komplement									
HP (1:10)	##	##	##	##	##	+	±	—	—
S (1:10)	##	##	##	##	##	+	±	—	—
HP (1:20)	##	##	##	+	±	—	—	—	—
S (1:20)	##	##	##	+	±	—	—	—	—

TABELLE III.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnung d. Hämolysins	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200
Komplement										
HP	##	##	##	##	##	+	+	±	—	—
HP	##	##	##	##	##	+	+	±	—	—
S	##	##	##	##	##	+	+	±	—	—

Aus diesen 3 Tabellen ist ersichtlich, dass das Heparin auf das Komplexhämolysin keine Hemmung ausübt, und dass dabei auch

das Heparinplasma sich als Komplement ebenso wie das Serum verhält.

Ich möchte hier noch kurz hinzufügen, dass eine grössere Menge Heparin, 5 sogar 10 mg pro 1 ccm Serum (1:10), in keinem hämolytischen System eine Hemmung aufwies.

Versuch 4.

Hämolysin: Komplexhämolysin H in konstanter Menge 1/100 angeordnet.

Erythrocyten: wie zuvor

Komplement: Meerschweinchenserum (1:10).

Novirudin: 0,1% Lösung in 0,85% NaCl-Lösung vorbereitet, in absteigender Reihe verdünnt.

Je 1 ccm wurde gemischt, jedes Reagenzglas enthielt also 4 ccm.

TABELLE IV.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Novirudin (mg in 1 ccm)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078
Hämolyse	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++

Versuch 5.

Aus der Tabelle IV ist ersichtlich, dass das Resultat zwischen Nr. 3 und Nr. 4 (d. h. Novirudinmenge 0,25 mg und 0,125 mg) einen

TABELLE V.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Novirudin (mg in 1 ccm)	0.3	0.27	0.24	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09
Hämolyse	—	—	—	—	±	+	++	+++

plötzlichen Wechsel zeigt. In dem Versuch 5 ist also die Hemmungskraft des Novirudins in geringerer Abstufung geprüft.

Der allmähliche Übergang ist nun ersichtlich.

Versuch 6.

Ich habe schon oben besprochen, dass durch Salzsäurefällung gereinigtes Novirudin auf die Hemmung der Blutgerinnung gegenüber seinem Rohpräparates 2–3 fach stärker wirksam ist. In diesem Versuch ist das gereinigte Novirudin auf eine antikomplementäre Kraft geprüft.

TABELLE VI.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Novirudin (mg in 1 ccm)	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,0156	0,0078
Hämolyse	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++

Man sieht, dass der Wendepunkt hier zwischen Nr. 4 und 5 (Novirudinmenge 0,125 mg und 0,0625 mg) fällt und dadurch die gerinnungshemmende Kraft mit der antikomplementären Kraft parallel geht.

Im folgenden Experiment dient das Novirudinplasma als Komplement im hämolytischen System.

Versuch 7.

Hämolysin: H in absteigender Reihe verdünnt.

Erythrocyten: 5% Suspension von Ziegenerythrocyten.

Komplement: 5 ccm Meerschweinchenblut mit 15 mg Novirudin in 1 ccm 0,85% NaCl-lösung versetzt, zentrifugiert. Erhaltenes Plasma(NP) mit 0,85% NaCl-lösung 10 fach verdünnt, als Komplement angewendet.

TABELLE VII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Hämolysen	—	—	—	—	—	—	—	—

In den folgenden Versuchen 8 und 9 ist gezeigt, dass das Heparin proteinogenes Hämolysin hemmend beeinflusst.

Versuch 8.

Hämolysin: H''(P) in konstanter Menge 1/400 angeordnet.

Erythrocyten: 5% Suspension von Ziegenerythrocyten.

Komplement: Meerschweinchenserum (1:10).

Heparin: 0,1% Lösung in 0,85% NaCl-Lösung vorbereitet, in absteigender Reihe verdünnt.

TABELLE VIII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Heparin (mg in 1 ccm)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078
Hämolysen	—	—	±	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿

Versuch 9.

Hämolysin: H'(P) in konstanter Menge 1/50 angeordnet.

Sonst wie vorher.

Ich habe mit einem anderen proteinogenen Antiziegenblut-hämolysin, welches durch Rinderblutinjektion an Kaninchen erzeugt wurde, einen ähnlichen Versuch gemacht und auch dasselbe Resultat bekommen.

TABELLE IX.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Heparin (mg in 1 ccm)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078
Hämolyse	—	—	±	≡	≡	≡	≡	≡

Im nächsten Versuch wird Heparin mit lipoidogenem Hämoly-
sin in einem hämolytischen System zusammengebracht.

Versuch 10.

Hämolsin: H(L) in konstanter Menge 1/50 angeordnet.

Erythrocyten: 5% Suspension von Ziegenerythrocyten.

Komplement: Meerschweinchenserum (1:10).

Heparin: wie zuvor verdünnt.

TABELLE X.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Heparin (mg in 1 ccm)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078
Hämolyse	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡

Es ist klar, dass Heparin auf proteinogenes Hämolsin keine
Hemmung ausübt. Das Novirudin dagegen beeinträchtigt sowohl
die Wirkung des proteinogenen, als auch des lipoidogenen Hämoly-
sins gleichartig, was aus den folgenden Tabellen XI, XII und XIII
ersichtlich ist.

Versuch 11.

Hämolsin: H''(P) in konstanter Menge 1/400 angeordnet.

Erythrocyten: 5% Suspension.

Komplement: Meerschweinchenserum (1:10).

Novirudin: 0,1% Lösung, in absteigender Reihe verdünnt.

TABELLE XI.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Novirudin (mg in 1 cem)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078
Hämolyse	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++

Versuch 12

Hämolysin: H'(P) in konstanter Menge 1/50.

Sonst wie vorher.

TABELLE XII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Novirudin (mg in 1 cem)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078
Hämolyse	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++

Versuch 13.

Hämolysin: H(L) in konstanter Menge 1/50.

Sonst wie vorher.

TABELLE XIII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Novirudin (mg in 1 cem)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078
Hämolyse	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++

In den Experimenten 14, 15 und 16 wird das Meerschweinchenoxalatplasma als Komplement im hämolytischen System angewendet.

Versuch 14.

Hämolysin: H''(P) 1/100 in absteigender Reihe verdünnt.

Erythrocyten: 5% Suspension.

Komplement: 1) Oxalatplasma von Meerschweinchenblut 10 fach verdünnt, in konstanter Menge angeordnet.

2) Zur Kontrolle Meerschweinchenserum (1:10).

TABELLE XIV.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Komplement								
Oxalatplasma	##	##	##	##	+	±	—	—
Serum	##	##	##	##	+	±	—	—

Versuch 15.

Hämolysin: H'(P) 1/25 in absteigender Reihe verdünnt.

Erythrocyten: wie zuvor

Komplement: Do.

TABELLE XV.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Komplement								
Oxalatplasma	##	##	##	+	±	±	—	—
Serum	##	##	##	+	±	±	—	—

Versuch 16.

Hämolysin: H(L) 1/50 in absteigender Reihe vordünnt.

Erythrocyten: wie zuvor

Komplement: Do.

Hämolysen war nach einer Stunde wie folgt.

TABELLE XVI.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
Komplement								
Oxalatplasma	±	±	±	±	—	—	—	—
Serum	±	±	±	±	+	±	—	—

Aus den Tabellen XIV und XV ist ersichtlich, dass das Oxalatplasma eine den Serum gleiche Stellung einnimmt und auf das proteinogene Hämolysin eine komplettierende Wirkung leistet, während es sich in der Tabelle XVI gegenüber dem lipoidogenen Hämolysin minderwertig verhält.

Versuch 17.

Hämolysin: H 1/100 in absteigender Reihe verdünnt.

Erythrocyten: wie zuvor

Komplement: Meerschweinchenserum wird nach Liefmann in Globulin- (G) und Albuminfraktion (A) gespalten. Beide Fraktionen werden der Regel entsprechend verdünnt, die Hälften von jeder mit Heparin versetzt (1mg Heparin für 10ccm Fraktion). (GH) und (AH).

- I. Hämolysin 1 ccm + Erythrocyten 1 ccm + G 1 ccm + AH 1 ccm
 II. „ „ „ + „ „ „ + A „ „ + GH „ „
 III. „ „ „ + „ „ „ + GH „ „ + AH „ „
 IV. „ „ „ + „ „ „ + G „ „ + A „ „

TABELLE XVII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Komplement								
G + AH	—	—	—	—	—	—	—	—
A + GH	—	—	—	—	—	—	—	—
GH + AH	—	—	—	—	—	—	—	—
G + A	⦿	⦿	⦿	+	±	—	—	—

Versuch 18.

Hämolysin: wie voriges

Erythrocyten: ebenso

Komplement: Meerschweinchenserum wird einerseits im voraus mit Heparin versetzt (2 mg Heparin pro 1 ccm Serum) und dann nach Liefmann in zwei Fraktionen geteilt (HG) u. (HA); anderseits Serum ohne Heparinzusatz in die beiden Fraktionen gespalten. (G) u. (A). Diese 4 Fraktionen werden wie folgt kombiniert:

TABELLE XVIII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Komplement								
G + HA	—	—	—	—	—	—	—	—
A + HG	⦿	+	+	±	±	—	—	—
HG + HA	—	—	—	—	—	—	—	—
G + A	⦿	+	+	±	±	—	—	—

- I. Hämolysin 1 cem + Erythrocyten 1 cem + G 1 cem + HA 1 cem
 II. „ „ „ + „ „ „ + A „ „ + HG „ „
 III. „ „ „ + „ „ „ + HG „ „ + HA „ „
 IV. „ „ „ + „ „ „ + G „ „ + A „ „

Versuch 19.

Hämolysin: wie zuvor

Erythrocyten: ebenso

Komplement: Meerschweinchenserum wird einerseits nach Novirudinzu-
 satz (2 mg Novirudin pro 1 cem Serum) nach
 Liefmann in die beiden Fraktionen zerlegt (NG)
 u. (NA); anderseits Serum ohne Novirudinzu-
 satz ebenso gespalten. (G) u. (A). Diese 4 Fraktionen
 werden kombiniert:

- I. Hämolysin 1 cem + Erythrocyten 1 cem + G 1 cem + NA 1 cem
 II. „ „ „ + „ „ „ + A „ „ + NG „ „
 III. „ „ „ + „ „ „ + NG „ „ + NA „ „
 VI. „ „ „ + „ „ „ + G „ „ + A „ „

TABELLE XIX.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Komplement								
G + NA	±	±	—	—	—	—	—	—
A + NG	⦿	⦿	⦿	⦿	+	±	—	—
NG + NA	—	—	—	—	—	—	—	—
G + A	⦿	⦿	⦿	⦿	+	±	—	—

In der II. Reihe der Versuche 18 und 19 verhält sich das HG und NG wie das G. Das zeigt nur an, dass das Heparin oder das Novirudin beim Durchleiten der Kohlensäure nicht mit Globulin gefällt wurde, oder dass das eventuell mitgefällte Heparin oder Novirudin nachher durch Wasser ausgewaschen wurde.

Versuch 20.

Hämolysin: H''(P).

Erythrocyten: wie zuvor

Komplement: 1) Meerschweinchenserum wird nach Liefmann in verdünnte Globulin- (G) und Albuminfraktion (A) geteilt, um diese darauf wieder in eine Mischung zusammenzubringen. (AG).

2) Als Kontrolle zu 1) wird Meerschweinchenserum mit 0,85% NaCl-lösung 20 fach verdünnt.

I. Hämolysin 1 cem + Erythrocyten 1 cem + AG 2 cem

II. „ „ „ + „ „ „ + S 2 cem

TABELLE XX.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
Komplement								
AG	⦚	⦚	⦚	+	±	—	—	—
S	⦚	⦚	⦚	⦚	+	±	—	—

Versuch 21.

Hämolysin: H'(P).

Erythrocyten: wie zuvor

Komplement: wie voriges

Mengenverhältnis: ebenso.

TABELLE XXI.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysins	1/25	1/150	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Komplement								
AG	⦿	⦿	⦿	+	±	—	—	—
S	⦿	⦿	⦿	⦿	+	±	—	—

Versuch 22.

Hämolysin: H(L)

Erythrocyten: wie zuvor

Komplement: ebenso

Mengenverhältnis: ebenso

TABELLE XXII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnung d. Hämolysin	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Komplement								
AG	—	—	—	—	—	—	—	—
S	⦿	⦿	⦿	+	±	—	—	—

In den Tabellen XX, XXI und XXII ist gezeigt, dass die Mischung der Komplementkomponenten gegenüber dem proteino-genem Hämolysin völlig wirksam ist, ganz schwach dagegen gegen-über dem lipoidogenen.

LITERATUR.

- Adler, O. u. Wiechowski, W. (1922): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **92**, 22.
- Brüda, B. E. (1928): Kl. Wochens., 7. Jahrg., 1742.
- Ecker, E. E. and Gross, P. (1929): Journ. of Infectious Diseases, **44**, 250.
- Fuchs, H. J. u. v. Falkenhausen, M. F. (1927): Biochem. Zeits., **184**, 172.
- Fuchs, H. J. u. Hartmann, E. (1928): Zeits. f. Immunitätsf., **58**, 1.
- Fuchs, H. J. (1928): ebenda, **58**, 14.
- Fuchs, H. J. (1929): ebenda, **59**, 424.
- Fuchs, H. J. (1929): ebenda, **62**, 107.
- Fuchs, H. J. (1929): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **145**, 108.
- Horino, K. (1928): Journ. of Biochem. **9**, 407.
- Howell, W. H. (1923): Amer. Journ. of Physiol, **63**, 434.
- Howell, W. H. (1925): ebenda., **71**, 553.
- Howell, W. H. (1928): Bull. of the Johns Hopkins Hospital, **42**, 199.
- Levene, P. A. : Monograph on Biology. Hexamines and Mucoproteins, London 1925.
- Waldschmidt-Leitz, E., Stadler, P. und Steigerwaldt, F. (1929): Zeits. f. physiol. Chemie, **183**, 39.

PHOSPHATE IM HARN BEI ZUFUHR VON GALLENSÄURE.

VON

KANZI FUZIWARA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1930)

Seit Schiff (1870) and Stadelmann (1896) ist allgemein bekannt, dass die Gallensäure einen enterohepatischen Kreislauf hat, indem die durch die Gallen in den Darm gelangte Gallensäure wieder von der Darmschleimhaut aufgenommen, von der Leber abgefangen und dann aufs neue zur Gallenbildung verwendet wird.

Es ist auch allgemein anerkannt, dass die Verdauung der Nahrung im Darm im alkalischen Medium vor sich geht, und dass diese Alkalität durch die Galle bedingt wird. Schon Karasawa (1926, 1927), Hatakeyama (1927) und Okamura (1928) haben nachgewiesen, dass die Gallensäure die Wirkung der Nucleinase in der Leber und im Darm sowie den Nucleinstoffwechsel im Organismus fördert und dass dadurch die Phosphorsäure im Harn sich vermehrt.

Die Ausscheidung der Phosphorsäure wird wesentlich durch die gleichzeitige Anwesenheit anderer Mineralstoffe, namentlich der alkalischen Erden beeinflusst. Schon Sekitoo (1929) hat bewiesen, dass das Calcium im Harn durch die Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird.

Auf Grund dieser Tatsachen kam Itoo (1930) zu der Ansicht, dass sich die Phosphate infolge der fördernden Wirkung der Gallensäure auf den Nucleinstoffwechsel in der Galle vermehren und dadurch die Wasserstoffionenkonzentration in der Galle beeinflusst werden muss, und er hat gefunden, dass das pH der Galle durch

Zufuhr von Gallensäure erhöht wird, und dass diese Steigerung des pH mit der Menge der Gallensäureausscheidung fast parallel geht. Dabei hat er betont, dass die Gallensäure in der Galle als regulierender Faktor der Wasserstoffionenkonzentration eine gewisse Rolle spielt und die Alkalität des Darmes bei der Verdauung beeinflusst.

Die Phosphate scheinen bei der Regulierung der Reaktion der Körpersäfte eine wichtige Rolle zu spielen. Mit den Mischungen von primären und sekundären Alkaliphosphaten, wie sie innerhalb des Organismus vorkommen, können sich erhebliche Quantitäten freier Säuren bzw. freier Basen umsetzen, ohne dass eine stark saure oder stark alkalische Reaktion auftritt. Entledigt sich der Organismus der unter der Säureeinwirkung entstandenen H_2PO_4 -Ionen durch die Nieren, so ist damit das Reaktionsgleichgewicht wiederhergestellt.

Es ist bekannt, dass die sauren primären und alkalischen sekundären Phosphate in den Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen vorhanden sind, und dass im Harn des Menschen ein primäres Phosphat und im Körpersaft ein sekundäres vorherrscht.

Nach diesen Daten kann man wohl zu der Auffassung kommen, dass die alkalisch reagierenden sekundären Phosphate im Harn sich durch Zufuhr von Gallensäure vermehren müssen, wenn das pH der Lebergalle durch Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird. In diesem Sinne habe ich die Phosphate im Harn untersucht.

Experimenteller Teil.

METHODIK.

Als Versuchstiere wurden im Käfig ruhig gehaltene, gut entwickelte männliche Kaninchen verwendet. Vor dem Versuche wurden die Kaninchen 2–3 Wochen lang mit folgender Nahrung gefüttert: Trockne Okara 50 g, frisches Gemüse 50 g und Wasser 120 ccm.

Erst nachdem das Körpergewicht und die Harnmenge eines

Tieres konstant geworden waren, wurde mit dem Versuch begonnen. Während des Versuches wurde den Kaninchen dieselbe Nahrung wie vorher verabreicht.

Der tägliche Harn wurde von morgens 8 Uhr bis zum nächsten Morgen 8 Uhr gesammelt und durch Katheterisieren scharf abgegrenzt.

Nachdem der tägliche Phosphatwert im Harn einige Tage hindurch annähernd konstant geblieben war, wurden dem Kaninchen 1.5–2.0 ccm einer 1%igen Natriumcholatlösung pro kg Körpergewicht an 1 oder 2 Tagen subkutan injiziert, und der Harn während der Injektionstage und an den folgenden 3–4 Tagen untersucht.

Der tägliche Harn wurde zentrifugiert und in die beiden Portion: Rückstand und Zentrifugat getrennt. Jedesmal wurden in den beiden Portionen die gesamten Phosphate und die primären Phosphate getrennt bestimmt und die Differenzen zwischen beiden Werten als die dem einfach sauren Phosphat angehörenden Phosphate bezeichnet.

Der Rückstand wurde in einem bestimmten Volumen Wasser suspendiert, und davon unter Schütteln 2 mal 50 ccm abpipettiert. In der einen Portion wurden die gesamten Phosphate durch Uranklösung titriert, und in der anderen Portion ohne Hinzufügen der Essigsäuremischung die primären Phosphate durch Uranklösung ebenfalls bestimmt.

Von dem Zentrifugat wurden 2 Portionen zu je 50 ccm abpipettiert; dann wurden in der einen Portion die gesamten Phosphate mittels Uranklösung, in der anderen Portion die primären Phosphate nach Freund bestimmt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Um das Ergebnis besser verständlich zu machen, habe ich den prozentualen Gehalt der von der gesamten Phosphorsäure auf das primäre und sekundäre Phosphat entfallenden Anteile angegeben und den prozentualen Gehalt bei Zufuhr von Gallensäure mit dem der Vor- und Nachperiode verglichen, welcher aus den durch-

schnittlichen Werten der primären und sekundären Phosphatmenge berechnet gefunden wurde.

Aus den Versuchen I–IX der Tabelle wird ersichtlich, dass von der gesamten Phosphorsäure 59.1–66.3%, durchschnittlich 61.4%, auf das einfach saure Phosphat, und 33.7–40.9%, durchschnittlich 34.6%, auf das zweifach saure Phosphat entfallen.

Aus den Daten kann man schliessen, dass im Kaninchenharn das sekundäre Phosphat vorherrschend ist.

Die Versuche I–IX zeigen, dass der prozentuale Gehalt des sekundären Phosphates bei Zufuhr von Gallensäure verglichen sowohl mit dem der Nach- als auch der Vorperiode bei 8 unter den 9 Fällen um 0.3–6.5% vermehrt gefunden wurde, während der des primären Phosphates gerade umgekehrt vermindert gefunden wurde. Nur bei einem Fall wurde das Ergebnis unbestimmt wurde. Nur bei einem Fall wurde kein eindeutiges Ergebnis gefunden.

Aus den obigen Befunden geht hervor, dass sich das sekundäre Phosphat im Kaninchenharn durch Zufuhr von Gallensäure vermehrt, während sich das primäre Phosphat im Gegensatz dazu vermindert.

Nach der Angabe von Hatakeyama (1927) wird die Phosphorsäureausscheidung im Harn des Kaninchens durch Zufuhr von Gallensäure gesteigert.

Aus meinen Daten geht hervor, dass die Vermehrung der Phosphorsäure bei Zufuhr von Gallensäure hauptsächlich auf der Vermehrung des sekundären Phosphates beruht.

Sekitoo hat kürzlich beobachtet, dass die Zufuhr von Gallensäure im Kaninchenorganismus die Ausscheidung der Erdalkalien, bzw. des Calciums im Harn stark fördert, während die der Alkalien (Na u. K) fast unbeeinflusst bleibt.

Auf Grund der oben genannten Daten komme ich zu dem Schluss, dass die Zufuhr von Gallensäure die Ausscheidung der Erdalkalienphosphate fördert. Die phosphorsauren Salze des Harns werden bekanntlich zum Teil im Organismus aus phosphorhaltigem organischem Material gebildet, von welchem in erster

VERSUCH I.

Phosphorsäure (g)					Bemerkung					
Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (cem)	Reaktion	spez. Gewicht		gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate	
							absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)
(1930) 8/9	2400	107	alkalisch	1021	0.1960	33.7	0.0652	0.1308	66.3	
9	2395	94	"	1023	0.1840		0.0640	0.1200		
10	2390	110	"	1020	0.1920		0.0720	0.1200		
11	2390	122	"	1024	0.1680		0.0480	0.1200		
12	2400	124	"	1024	0.2160		0.0720	0.1440	67.1	
13	2406	106	"	1020	0.2278		0.0780	0.1498	65.7	
14	2440	120	"	1024	0.2084	35.8	0.0680	0.1404	64.2	
15	2397	118	"	1022	0.1690		0.0620	0.1070		
16	2395	112	"	1025	0.1910		0.0700	0.1210		
17	2402	120	"	1024	0.1590		0.0600	0.0990		
Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 1.5 cem injiziert										
" " "										
" " "										

Cholatlösung
pro kg Körper-
gewicht 1.5 cem
injiziert

" "

" "

VERSUCH II.

Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (cm)	Reaktion	spez. Gewicht	Phosphorsäure (g)						Bemerkung
					gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate			
						absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)		
(1930) 12/9	2780	120	alkalisch	1016	0.2160	0.0800	0.1360	64.3	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 1.5 cm injiziert		
13	2775	120	"	1022	0.2000	0.0760	0.1240				
14	2760	120	"	1020	0.2120	0.0680	0.1440				
15	2760	112	"	1020	0.2120	0.0760	0.1360				
16	2772	109	"	1026	0.2280	0.0780	0.1500	65.8	"		
17	2786	118	"	1022	0.2320	0.0800	0.1520	65.5	"		
18	2764	121	"	1020	0.2260	0.0740	0.1520	65.0			
19	2785	100	"	1024	0.1970	0.0640	0.1330				
20	2787	112	"	1025	0.1880	0.0700	0.1180				
21	2769	108	"	1026	0.2100	0.0780	0.1320				

VERSUCH III.

Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (ccm)	Reaktion	spez. Gewicht	Phosphorsäure (g)						Bemerkung
					gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate			
						absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)		
(1930) 12/9	2370	123	alkalisch	1021	0.2040	0.0760	} 37.3	0.1280	} 62.7	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 1.5 ccm injiziert ↓	
13	2365	112	"	1022	0.2000	0.0680		0.1320			
14	2345	102	"	1024	0.2280	0.0920		0.1360			
15	2350	120	"	1026	0.2260	0.0840		0.1420			
16	2375	121	"	1022	0.2600	0.0800	30.8	0.1800	69.2		↓
17	2360	105	"	1020	0.2520	0.0840	33.4	0.1680	66.6	"	
18	2360	98	"	1026	0.2080	0.0720	} 35.6	0.1360	} 64.4		
19	2370	105	"	1022	0.1840	0.0632		0.1208			
20	2375	124	"	1020	0.1650	0.0620		0.1030			
21	2358	120	"	1024	0.2010	0.0720		0.1290			

Cholatlösung
pro kg Körper-
gewicht 1.5 ccm
injiziert

← " "

VERSUCH IV.

Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (ccm)	Reaktion	spez. Gewicht	Phosphorsäure (g)						Bemerkung
					gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate			
						absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)		
(1930)	2520	99	alkalisch	1025	0.1800	0.0773	0.1027	60.8	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 1.5 ccm injiziert		
16/9	2530	116	"	1020	0.1867	0.0747	0.1120				
17	2525	120	"	1021	0.1853	0.0667	0.1186				
18	2520	108	"	1024	0.2027	0.0767	0.1260				
19	2535	100	"	1022	0.2167	0.0820	37.9	0.1347	62.1	"	
20	2530	124	"	1022	0.2196	0.0796	37.0	0.1400	63.0	"	
21	2522	110	"	1024	0.2027	0.0840	43.8	0.1187	56.2		
22	2520	120	"	1025	0.1746	0.0867		0.0879			
23	2536	102	"	1020	0.2080	0.0760		0.1320			
24	2500	115	"	1022	0.1946	0.0947		0.1000			
25											

VERSUCH V.

Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (ccm)	Reaktion	spez. Gewicht	Phosphorsäure (g)						Bemerkung
					gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate			
						absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)		
(1930) 16/9	2750	100	alkalisch	1024	0.1780	0.0680	40.9	0.1100	59.1	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 2.0 ccm injiziert ← " " ← " "	
17	2770	140	"	1014	0.1880	0.0747		0.1133			
18	2780	115	"	1020	0.1760	0,0747		0.1013			
19	2755	112	"	1026	0.1693	0.0733		0.0960			
20	2752	97	"	1024	0.1963	0.0730	39.4	0.1163	60.6		
21	2760	120	"	1024	0.2213	0.0785	35.5	0.1428	64.5		
22	2780	135	"	1020	0.1740	0.0653	40.5	0.1087	59.5		
23	2774	115	"	1020	0.1607	0.0587		0.1020			
24	2771	120	"	1024	0.1820	0.0707		0.1013			
25	2776	102	"	1026	0.1713	0.0733		0.0980			

Cholatlösung
pro kg Körper-
gewicht 2.0 ccm
injiziert

←

←

"

"

VERSUCH VI.

Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (ccn)	Reaktion	spez. Gewicht	Phosphorsäure (g)						Bemerkung
					gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate			
						absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)		
(1930) 22/9	2526	98	alkalisch	1026	0.1987	0.0710	38.1	0.1277	61.9	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 1.5 ccn injiziert ←	
23	2540	95	”	1024	0.1900	0.0767		0.1133			
24	2482	106	”	1022	0.2035	0.0768		0.1267			
25	2500	96	”	1026	0.2037	0.0800		0.1267			
26	2531	110	”	1024	0.2147	0.0760	37.8	0.1307	62.2		←
27	2560	120	”	1024	0.2243	0.0770	36.9	0.1383	63.1	”	
28	2560	101	”	1022	0.2080	0.0800	38.5	0.1280	61.5		
29	2520	125	”	1022	0.1880	0.0700		0.1180			
30	2562	118	”	1026	0.1833	0.0713		0.1120			
1/10	2566	110	”	1024	0.1907	0.0750		0.1157			

Cholatlösung
pro kg Körper-
gewicht 1.5 cem
injiziert

← " "

VERSUCH VII.

Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (cem)	Reaktion	spez. Gewicht	Phosphorsäure (g)						Bemerkung
					gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate			
						absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)		
(1930) 28/9	2290	116	alkalisch	1022	0.1880	0.0670	38.3 }	0.1210	61.7 }	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 2.0 cem injiziert ↓	
29	2300	100	"	1024	0.1733	0.0670		0.1063			
30	2310	98	"	1023	0.1767	0.0697		0.1070			
1/10	2295	95	"	1024	0.1773	0.0763		0.1010			
2	2300	120	"	1022	0.1960	0.0732	37.4	0.1228	62.6		↓
3	2300	105	"	1020	0.1986	0.0720	36.3	0.1266	63.7	"	
4	2320	119	"	1022	0.1920	0.0667	41.0 }	0.1253	59.0 }		
5	2310	126	"	1020	0.1650	0.0707		0.0943			
6	2290	112	"	1018	0.1813	0.0820		0.0993			
7	2305	114	"	1024	0.1733	0.0720		0.1013			

Cholatlösung
pro kg Körper-
gewicht 2.0 ccm
injiziert
←

←

"

"

VERSUCH VIII.

Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (cem)	Reaktion	spez. Gewicht	Phosphorsäure (g)				Bemerkung	
					gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate		
						absolut	% (der gesamten)	absolut		% (der gesamten)
(1930) 5/10	2365	105	alkalisch	1020	0.1820	0.0720	0.1100	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 1.5 cem injiziert		
6	2350	118	"	1022	0.1830	0.0770	0.1090			
7	2350	109	"	1024	0.1713	0.0692	0.1021			
8	2360	118	"	1020	0.1786	0.0613	0.1173			
9	2365	120	"	1021	0.1916	0.0714	0.1202	62.7		
10	2370	123	"	1020	0.2112	0.0766	0.1346	63.7		
11	2340	130	"	1020	0.1864	0.0822	0.1042	61.0		
12	2360	106	"	1024	0.1660	0.0624	0.1036			
13	2348	122	"	1023	0.1690	0.0598	0.1092			
14	2368	102	"	1024	0.1886	0.0732	0.1154			

VERSUCH IX.

Phosphorsäure (g)										
Datum	Körper- gewicht (g)	Harn- menge (ccm)	Reaktion	spec. Gewicht	gesamte Phos- phate	primäre Phosphate		sekundäre Phosphate		Bemerkung
						absolut	% (der gesamten)	absolut	% (der gesamten)	
(1930)										
5/10	2465	122	alkalisch	1024	0.1800	0.0647	39.1	0.1153	60.9	Cholatlösung pro kg Körper- gewicht 2.0 ccm injiziert ←
6	2460	112	"	1022	0.1833	0.0680		0.1163		
7	2446	103	"	1024	0.1847	0.0720		0.1117		
8	2448	120	"	1020	0.1707	0.0640		0.1067		
9	2465	110	"	1022	0.1920	0.0722	37.7	0.1198	62.3	" ←
10	2455	100	"	1024	0.2100	0.0790	37.7	0.1310	62.3	" ←
11	2450	105	"	1024	0.2104	0.0800	39.0	0.1304	61.0	
12	2460	98	"	1025	0.1862	0.0584		0.1278		
13	2470	120	"	1020	0.1650	0.0714		0.0946		
14	2472	115	"	1021	0.1810	0.0702		0.1108		

Cholatlösung
pro kg Körper-
gewicht 2.0 cem
injiziert

←

←

"

"

Linie die Nucleoproteide, Knochen, Lecithin und andere Phosphate zu nennen sind. Die Vermehrung der sekundären Phosphate im Harn ist höchstwahrscheinlich durch die fördernde Wirkung der Gallensäure auf den Nucleinstoffwechsel bedingt.

Diese Tatsache scheint darauf hinzudeuten, dass sich das sekundäre Erdalkalienphosphat in den Körperflüssigkeiten vermehrt, und dadurch die Alkalireserve der Körperflüssigkeit gesteigert wird.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Im Kaninchenharn ist das sekundäre Phosphat stärker vertreten als das primäre.

2. Die Ausscheidung des sekundären Phosphates im Harn wird durch Zufuhr von Gallensäure gesteigert, während die des primären dadurch herabgesetzt wird.

3. Die vermehrte Ausscheidung der Phosphorsäure im Harn bei Zufuhr von Gallensäure beruht auf der Vermehrung des sekundären Phosphates.

Aus den Daten scheint mir hervorzugehen, dass dadurch das pH des Harns erhöht wird.

LITERATUR.

- Schiff, M. (1870): Pflüger's Arch., **3**, 598.
Stadelmann, E. (1896): Zeitschr. f. Biol., **34**, 1.
Karasawa, R. (1926): The Journ. of Bioch., **6**, 139.
" " " " **7**, 145.
Hatakeyama, T. (1927): The Journ. of Bioch., **8**, 248.
Okamura, Takeji (1928): " **8**, 391.
Ito, T. (1930): Arbeiten aus d. med. Universität zu Okayama, **2**, 103.
Freund, E. (1892): Zentralbl. f. die med. Wissensch., 689.
Sekitoo, T. (1929): The Journ. of Bioch., **11**, 251.

KONSTITUTION DER POLYPEPTIDE UND PROTEOLYTISCHE FERMENTE.

VON

KORETAKA SUZUKI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1930)

Über die Beziehung der Konstitution der Polypeptide zum Wirkungsbereich der proteolytischen Fermente wurde zuerst von Fischer und Abderhalden (1905) berichtet. Deren Ergebnisse wurden aber, wenn sie auch lange anerkannt waren, durch die von Waldschmidt-Leitz und Harteneck (1925) veröffentlichten Untersuchungen natürlicherweise verändert. Dabei glaubte man zuerst, dass das Trypsin synthetisch dargestellte einfache Peptide nicht spaltete. Aber durch die weiteren Forschungen von Waldschmidt-Leitz, Abderhalden u. a. ist klar geworden, dass gewisse Arten von Peptiden durch Trypsin hydrolysierbar sind.

Unter diesen Untersuchungen ist diejenige mit den acylierten Peptiden besonders interessant. Diese büßen nämlich die ereptische Spaltbarkeit dadurch ein, dass eine Acylgruppe, sei es β -Naphthalinsulfonyl-, Phthalyl-, Benzoyl-, Acetyl- oder Carboäthoxyl, an die freie Aminogruppe gebunden wird; sie werden nun durch Trypsin und Trypsin-Kinase spaltbar und sollen dabei von der Natur des an den Peptiden vorliegenden Aminosäurerestes nicht abhängig sein. Die Ursache der Spaltbarkeit der acylierten Peptide durch Trypsin soll überhaupt darin zu suchen sein, dass die Säurenatur der Carboxylgruppe der Peptide, infolge der Bedeckung der freien Aminogruppe, verstärkt wird.

Ferner ist es interessant, dass gewisse tyrosinhaltige Polypeptide durch Trypsin spaltbar sind. Waldschmidt-Leitz, Schöffner, Schlatter und Klein (1928) beobachteten, dass

l-Leucyl-triglycyl-*l*-tyrosin nur durch Trypsin und Trypsin-Kinase gespalten wird, während die Tri- und Tetrapeptide, *l*-Leucyl-glycyl-*l*-tyrosin und Glycyl-*d*-alanyl-*l*-tyrosin und Glycyl-*d*-alanyl-glycyl-*l*-tyrosin, sowohl durch Erepsin, als auch durch Trypsin und Trypsin-Kinase gespalten werden. Wenn man in Betracht zieht, dass Glycyl-*l*-tyrosin ein spezifisches Substrat des Erepsins ist, müsste die Länge der Peptidkette als ein Bestimmungsfaktor des Wirkungsbereichs der Proteasen anerkannt werden.

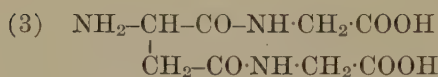
Da aber andererseits bekannt ist, dass die Anzahl der Aminosäuren im Aufbau der Polypeptide nicht immer etwas mit der tryptischen Spaltbarkeit zu tun hat, so könnte man wohl annehmen, dass die an die Phenylgruppe gebundene OH-Gruppe in diesem Fall von besonderer Bedeutung ist, und zwar, dass diese OH-Gruppe irgendeinen verstärkenden Einfluss auf die Säurenatur der freien COOH des Tyrosins hat. Aber es ist auch möglich zu denken, dass der Tyrosinrest selbst in der Polypeptidkette, oder im allgemeinen gesprochen, die Arten einer an der Bildung von Polypeptid beteiligten Aminosäure überhaupt, die tryptische Spaltbarkeit bestimmt. Waldschmidt-Leitz, Klein u. Schöffner (1928) haben wohl gefunden, dass *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin nicht nur durch Erepsin, sondern auch durch Trypsin-Kinase gespalten werden können. Die Beziehungen zwischen der Angreifbarkeit durch Trypsin und der verstärkten Säurenatur von Polypeptid sind aber von Abderhalden und Schwab (1929) noch in Zweifel gezogen. Der Grund ihres Zweifels besteht darin, dass *dl*-Bromisocapronyl-*l*-tyrosin und *dl*-Bromisocapronyl-*dl*-phenylalanin durch Trypsin nicht zu spalten sind, aber *dl*-Leucyl-*l*-histidin und *dl*- α -Bromisocapronyl-*l*-histidin durch dasselbe gespalten werden können.

In neuerer Zeit wurde von Abderhalden, Schwab und Bahn (1927–1930) berichtet, dass *d*-Glutaminyl-*l*-tyrosin, Glycyl-*l*-tyrosin, *d*, *l*-Alanyl-*l*-tyrosin, *d*, *l*-Norleucyl-*l*-tyrosin, *d*, *l*-Norvalyl-*l*-tyrosin, *d*, *l*-Valyl-*l*-tyrosin, und *d*, *l*-Leucyl-*l*-tyrosin, obgleich von Dipeptidnatur, durch Trypsin-Kinase spaltbar sind. Diese tyrosin-

haltigen Dipeptide kommen aber auch durch Erepsin zur Spaltung. Die Angabe, dass Glycyl-*l*-tyrosin auch durch Trypsin-Kinase spaltbar ist, widerspricht der von Waldschmidt-Leitz, Grassmann und Schlatter (1927); man muss also auf weitere Untersuchungen warten. Wenn man im Anschluss an die bisher erfolgten Untersuchungen der oben genannten Autoren über die Beziehung der chemischen Struktur zur tryptischen Angreifbarkeit nachdenkt, so scheint es sich, wie schon oben angedeutet, um die Länge der Polypeptidkette, die verstärkte Säurenatur des Polypeptid und seine Tyrosinhaltigkeit zu handeln. Jedenfalls werden die künstlich dargestellten Polypeptide, welche uns durch Trypsin-Kinase als spaltbar bekannt sind, auch durch Trypsin oder Erepsin gespalten. Daher kann man leicht erkennen, dass es zum Fortschritte der Eiweisschemie beitragen würde, wenn ein Substrat aus Aminosäuren synthetisiert würde, das nur durch Trypsin-Kinase spaltbar ist. Ein solches Polypeptid muss sicher vorhanden sein, da man durch die Arbeit von Waldschmidt-Leitz und Künstner (1927) weiss, dass die NH_2 - und COOH -Gruppe bei Hydrolyse des Eiweisses durch Pepsin oder Trypsin-Kinase immer im Verhältnis 1:1 zunimmt.

Wir hatten schon früher ein grosses Interesse an der Frage, welchen Einfluss überhaupt Monoaminodicarbonsäure oder Diaminomonocarbonsäure als ein Baustein der Polypeptide auf die fermentative Hydrolysierbarkeit auszuüben imstande ist. Unter den Dicarbonsäuren ist die Asparaginsäure zur Untersuchung am meisten geeignet und Nakashima (1927) beobachtete früher bei der Untersuchung mit aus Glycin und Asparaginsäure bestehendem Dipeptid, dass Glycyl--asparagin durch Erepsin viel besser als Glycyl-asparaginsäure und Asparagylglycin gespalten wird. Aber nicht jedes Dipeptid ist durch Trypsin zu spalten. Es interessierte uns nun zu untersuchen, welche Veränderung in dem fermentativen Verhalten sich zeigen wird, wenn die Dipeptidkette zu Tripeptid verlängert würde. Ich habe daher Glycyl-glycyl-*l*-asparagin(1), Glycyl-glycyl-*l*-asparaginsäure(2), *dl*-Asparagyl-

diglycin(3) und Glycyl-*dl*-asparagyl-glycin(4) zur Darstellung gebracht.



Bei der Einwirkung von Papain, Papain-HCN, Pepsin, Trypsin, Trypsin-Kinase und Erepsin auf diese vier Tripeptide beobachtete ich, dass dieselben nur durch Erepsin, aber nicht durch die anderen gespalten werden können.

Substrate	Zeit in Stdn.			
	0	4	24	120
1. Glycylglycylasparagin	0%	67%	109%	130%
2. Glycylglycylasparaginsäure	0	30	63	83
3. Glycylasparagylglycin	0	1,5	18	56
4. Asparagyl diglycin	0	0	10	25

Dabei wird Glycyl-glycyl-*l*-asparagin am stärksten gespalten und nach 24 Stunden kommt 109% Hydrolyse zu Stande. Dann folgt Glycyl-glycyl-*l*-asparaginsäure: 63% Hydrolyse in derselben Zeit. Das hydrolytische Prozent wird aus der Zunahme des Amino-N berechnet, den präformiert vorhandenen Amino-N als eins annehmend; die vollständige Spaltung macht also 200%. Dagegen werden Glycyl-*dl*-asparagyl-glycin und *dl*-Asparagyl-

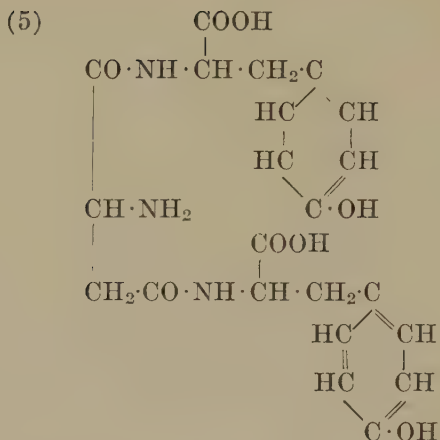
diglycin in viel geringerem Grade gespalten. Aber da diese zwei Triptide, wie ihre Synthese zeigt, razemische Asparaginsäure enthalten, ist ihre Spaltbarkeit mit der der anderen Triptiden, welche das natürliche Asparagin oder Asparaginsäure enthalten, nicht ohne weiteres zu vergleichen.

Aus dem obigen Ergebnis kann man ersehen, dass die einfache Verlängerung der Kette dem aus Glycin und Asparaginsäure aufgebauten Dipeptid nicht die Beschaffenheit eines Substrats des Trypsins gewährt. Die ausgeprägte Säurenatur der Substrate und die Anordnung der 2 Moleküle Glycin und ein Molekül Asparaginsäure in der Peptidbindung spielen dabei keine Rolle. Man sieht ausserdem dass durch Bedeckung einer COOH-Gruppe des Asparaginsäurerests mit einer Aminogruppe die Glycyl-glycyl-*l*-asparaginsäure leichter hydrolysierbar wird, wie es bei Glycyl-*l*-asparaginsäure der Fall war.

Ich komme nun zum zweiten Gedankengang, und zwar handelt es sich um Tyrosin. Die Angaben von Waldschmidt-Leitz, Grassmann und Schlatter(1927) über das *l*-Leucyl-triglycyl-*l*-tyrosin, sowie die von Abderhalden und Schwab (1929) über *dl*-Phenylalanyl-*l*-tyrosin und *l*-Tyrosyl-*l*-tyrosin sind sehr schätzenswert. Jenes tyrosinhaltige Tetrapeptid ist aber sowohl durch Trypsin-Kinase als auch durch Trypsin spaltbar.

Ob die letzten zwei Dipeptide auch noch durch das nicht aktivierte Trypsin gespalten werden können, ist leider noch nicht klargestellt. Wenn das Tyrosin, an dem Peptidaufbau teilnehmend, ihm eine neue Beschaffenheit als enzymatisches Substrat verleiht, könnte man bei einer Peptidverbindung aus Asparaginsäure und Tyrosin ein spezifisches Verhalten gegen Protease erwarten. Ich stelle daher *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin(5) dar.

Das Ergebniss mit diesem Tripeptid war sehr bemerkenswert. Dieses Substrat war durch Pepsin, Trypsin (nicht aktiviert), Papain, Papain-HCN und Erepsin nicht spaltbar. Bei der Einwirkung von Trypsin-Kinase konnte dagegen eine deutliche Hydrolyse beobachtet werden. Der bei verschiedener Azidität ausgeführte



Versuch ergab, dass das *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin am besten bei Ph 8,3 spaltbar war.

Zeit in Stdn.	Ph	7,11	7,76	8,33	9,16
0		0%	0%	0%	0%
24		5,0	16,0	18,0	5,0
48		13,3	26,6	30,0	13,3
120		51,7	66,7	76,6	50,0

Es ist sehr interessant, dass das *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin unter den verschiedenen Proteasen nur von Trypsin, und zwar im von Enterokinase aktivierten Zustande spaltbar ist. Soweit uns bis heute bekannt, wird jenes, das durch Trypsin-Kinase hydrolysierbar ist, zugleich auch durch Trypsin gespalten. Es kommt nicht darauf an, ob es sich um synthetisch dargestellte Polypeptide oder partielle Spalteprodukte von Eiweiss handelt. Protamin macht auch keine Ausnahme. Die Wirkung der Enterokinase ist in solchen Fällen nur auf die Verstärkung der Trypsinwirkung beschränkt. Mit anderen Worten: die Wirkung des Trypsins wird durch Aktivie-

rung nicht qualitativ erweitert, sondern bloss im quantitativen Sinne vergrössert. Nur bei der Hydrolyse des hochmolekularen Eiweisses ist die Enterokinase absolut notwendig.

Ein einfaches Substrat, das ausschliesslich durch aktiviertes Trypsin angegriffen wird, dessen chemische Konstitution wohl bekannt ist, und das vor allem im Laboratorium künstlich aus den Aminosäuren aufgebaut werden kann, war aus manchen Gründen erwünscht. Und hier liegt die Bedeutung des *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin, des rein spezifischen Substrats für Trypsin-Kinase.

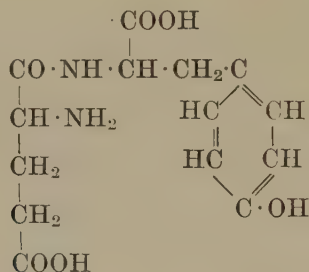
Eine neue Einteilung der Fermente wurde neuerdings von Waldschmidt-Leitz und Purr (1929) veröffentlicht. Ihrer Meinung nach sollen die, welche bisher als Erepsin bezeichnet wurden, nichts anderes als ein Gemisch von Dipeptidase und Aminopolyptidase, und solche, die man als Trypsin bezeichnete, ein Gemisch von Proteinase und Carboxypolypeptidase sein. Das Eiweiss wird nur dann durch Proteinase gespalten, wenn dieselbe mit Kinase aktiviert wird. Und Proteinase wirkt auf alle dabei untersuchten Substrate nicht ein, wenn Kinase nicht vorhanden ist. Dagegen wirkt Carboxypolypeptidase auf verschiedene Polypeptide ein, und beim Vorhandensein von Kinase wird die Aktivität nur vergrössert, und auf Protamin kann das Ferment auch ohne Kinase einwirken. Dieser Angabe nach war das von mir gebrauchte Trypsin ein Gemisch von Proteinase und Carboxypolypeptidase. Um nun zur Entscheidung zu bringen, welches von den zwei Fermenten in der gebrauchten Fermentlösung zur Einwirkung auf das Tripeptid kommt, wurde nach Waldschmidt-Leitz's Methode mehrmalige Adsorption mit der Tonerde C_{γ} bei Ph 7,0 durchgeführt, und dann das Elut und die Restlösung nach der Aktivierung mit Enterokinase zur Einwirkung auf das Substrat gebracht. Eine mehr oder weniger geringe Spaltung war bei beiden Fermenten zu finden.

Es ist zwar noch zweifelhaft, ob die Trennung der Proteinase von der Carboxypolypeptidase vollkommen ausgeführt worden ist. Aber daraus, dass nur beim Vorhandensein von Enterokinase das

dl-Asparagyl-di-*l*-tyrosin gespalten wird, kann man wohl annehmen, dass es sich bei dem an der Spaltung teilnehmenden Ferment nicht um Carboxypolypeptidase, sondern um Proteinase handelt.

Wie dem auch sein mag, es war uns sehr interessant zu sehen, dass die Verbindung der Asparaginsäure mit Glycin, sei es Di- oder Tripeptid, und sei es amidiert oder nicht, lediglich durch Erepsin gespalten wird, dass dagegen, wenn diese Monoaminodicarbonsäure nun mit Tyrosin verbunden wird, die erhaltene Substanz zum spezifischen Substrat von Trypsin-Kinase wird.

Das von Abderhalden und Schwab (1927) angegebene *d*-Glutaminyl-*l*-tyrosin



ist durch Trypsin-Kinase und Erepsin hydrolysierbar. Von der Wirkung des enterokinasefreien Trypsin weiss man nichts. Angenommen, dass Asparaginsäure ihrer Struktur nach fermentativ von gleicher Natur wie die Glutaminsäure wäre, so würden dann die Dipeptide aus Tyrosin und Monoaminodicarbonsäure durch das Erepsin und höchst wahrscheinlich durch das nicht aktivierte Trypsin gespalten werden, wenn nur die der NH_2 -Gruppe nahe liegende COOH -Gruppe in der letztgenannten Säure durch Tyrosin besetzt wäre. Aber wenn die andere COOH -Gruppe des Asparaginsäurerests mit dem zweiten Molekül Tyrosin gebunden wäre, würde die Spaltbarkeit durch das Erepsin und das nicht aktivierte Trypsin eingebüsst, und die Verbindung würde zum spezifischen Substrat von Trypsin-Kinase werden.

Man kann also die bisher gewonnenen Resultate wie folgt

zusammenstellen, gleiches Verhalten des noch nicht geprüften Asparagyl-mono-*l*-tyrosins und des Glutaminy-*l*-tyrosins von Abderhalden gegen Protease annehmend:

	Asparagyl- glycin	Asparagyl- diglycin	Asparagyl- <i>l</i> -tyrosin	Asparagyl- di- <i>l</i> -tyrosin
Erepsin	+	+	+	—
Trypsin	—	—	+?	—
Trypsin- Kinase	—	—	+	+

Experimenteller Teil.

DARSTELLUNG DER POLYPEPTIDE.

1). *Glycyl-glycyl-l-asparagin*.

a. Chloracetyl-glycyl-*l*-asparagin.

Das Glycylasparagin wurde auf gewöhnliche Weise mit Chloracetyl-chlorid gekuppelt. Das Kuppelungsprodukt wurde mit Alkohol extrahiert und der durch folgende Abdampfung des Alkohols gewonnene Kristall einmal aus Wasser umkristallisiert. Der Kristall war nadelförmig. Zur Analyse wurde er im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Die Ausbeute betrug 55% der Theorie.

Analyse: (Bei 100°C , 17 mm. über P_2O_5 , 24 St. getrocknet.)

0,10128 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 11,09 ccm $\text{n}/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$

Für $\text{Cl C}_8\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_3$ (265,58) Ber. 15,84% N. Gef. 15,34% N.

b. Aminierung.

18 g Chloracetylglycyl-asparagin wurden in der 7 fachen Menge 28% Ammoniaks gelöst und 5 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde die durch Eindampfen des Ammoniaks unter vermindertem Druck bei niederer Temperatur erhaltene sirupöse Masse mit Wasser aufgenommen und mit Alkohol gefällt. Die anfangs ölige Masse kam allmählich zur Erstarrung. Sie wurde

wieder in Wasser aufgenommen und mit Alkohol gefällt. Nach mehrmaligem Wiederholen dieses Verfahrens bekam man ein weissliches Pulver. Aus Wasser umkristallisiert, zeigte sich die Substanz als blättchen-artiger Kristall. Diese Substanz löst sich leicht in warmem Wasser, aber schwer in kaltem, nicht in Alkohol. Die Ausbeute betrug 33% der Theorie.

Für die Analyse wurde bei 100°C über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Kristallwasser 1 mol.

Analyse:

0,31159 g Substanz, über P_2O_5 im Vakuum bei 100°C getrocknet, verloren 0,0187 g Wasser. Für $C_8H_{14}O_5N_4 + H_2O$ (264,2)
Ber. 6,06% H_2O . Gef. 6,01% H_2O .

0,0393 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 6,33 ccm $n/10$ H_2SO_4 . Für $C_8H_{14}O_5N_4$ (246,2). Ber. 22,76% N.
Gef. 22,55% N.

0,0132 g Substanz lieferten 1,34 ccm NH_2-N (20°C 752 mm)
(van Slyke). Ber. 5,69% NH_2-N . Gef. 5,72% NH_2-N .

2). *Glycyl-glycyl-l-asparaginsäure.*

a. Chloracetylglycyl-l-asparaginsäure.

12 g Glycyl-asparaginsäure wurden in 110,5 ccm $n-NaOH$ gelöst und unter kräftigem Schütteln und Kühlen abwechselnd 7,8 g Chloracetylchlorid und 110,5 ccm $n-NaOH$ in kleinen Portionen zugesetzt. Nach Ansäuern mit 154,7 ccm $n-HCl$ wurde die Lösung unter stark vermindertem Druck bei niedriger Temperatur bis zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit Alkohol extrahiert. Nach Eindampfen des Alkohols blieb ein gelblicher Sirup. Dieser Sirup zeigte nach mehrtägigem Stehen keine Neigung zur Kristallisation. Um die Aminierung auszuführen, wurde der Sirup über H_2SO_4 im Vakuum bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Die Ausbeute betrug 15 g.

b. Aminierung.

Der Chlorkörper wurde mit der 7 fachen Menge 28% Am-

moniaiks durch 3 tägiges Stehen bei Zimmertemperatur aminiert. Dann wurde die Lösung im Vakuum bei niederer Temperatur zur Trockene verdampft, der Rückstand zwecks Entfernung des Ammoniaiks und Chlors wie üblich mit Baryt und Silbersulfat behandelt, und die von Halogen und Ammoniak befreite Lösung sodann unter vermindertem Druck stark eingeengt. Die so erhaltene gelbliche Lösung wurde mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Nach längerem Stehen in der Kälte schieden sich nadelförmige Kristalle aus. Zur Reinigung wurde die Substanz aus heissem Wasser umkristallisiert. Die Substanz schmilzt nach vorhergehender Bräunung bei gegen 217°C (unkorr.) unter Zersetzung. Ausbeute 7,0 g.

Analyse: (Bei 100°C unter 15 mm Druck 24 Stunden lang über P_2O_5 getrocknet.)

0,0502 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 6,21 ccm n/10 H_2SO_4 . Für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}_3$ (247,1) Ber. 17,0%N. Gef. 17,3%N.

0,0251 g Substanz lieferten 2,51 ccm $\text{NH}_2\text{-N}$ (21°C 762 mm) nach van Slyke. Ber. 5,66% $\text{NH}_2\text{-N}$. Gef. 5,67% $\text{NH}_2\text{-N}$.

3). *Glycyl-dl-asparagyl-glycin.*

a. Chloracetylasparagyl-glycin.

5 g Asparagyl-monoglycin wurden in 65,8 ccm (2,5 mol.) n-NaOH gelöst und bei 0°C unter Schütteln in 6 Portionen abwechselnd 3,7 g (1,2 mol.) Chloracetylchlorid und 36,8 ccm (1,4 mol.) n-NaOH zugegeben.

Nach 1/2 st ndigem Stehen in der Kälte wurde die Lösung mit 65,8 ccm (2,5 mol.) n-HCl versetzt und im Vakuum zur Trockene eingedampft, und der Rückstand mit Alkohol extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Alkohols hinterblieb ein gelblicher Sirup. Beim längeren Stehen schied sich darin eine kleine Menge von Kristallen aus, aber eine gute Kristallisation der gesuchten Substanz gelang mir leider nicht. Daher wurde der Sirup für weitere Aminierung über H_2SO_4 getrocknet. Die Ausbeute betrug 5,8 g.

b. Aminierung.

Der Chlorkörper wurde mit der 7 fachen Menge 28% Ammoniaks übergrossen und 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Lösung wurde dann durch die Vakuumdestillation bis zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und nach der Barium-hydroxyd-Silbersulfatmethode von Halogen und Ammoniak befreit und im Vakuum bis zum Sirup eingeengt. Nach kurzem Stehen schieden sich Kristalle ab. Zur Analyse wurde einmal aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 2,5 g. Kristallform; Nadelchen. Schmelzpunkt: 225°C (unkorr.) unter Zersetzung. Die Substanz ist löslich in warmem Wasser, etwas schwer in kaltem, und unlöslich in Alkohol.

Analyse: (Bei 100°C unter 15 mm Druck 30 Stunden über P_2O_5 getrocknet).

0,031 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 3,81 ccm n/10 H_2SO_4 . Für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}_3$ (247,1) Ber. 17,0%N. Gef. 17,2%N.

0,0103 g Substanz lieferten 1,02 ccm $\text{NH}_2\text{-N}$ (20°C 761 mm) nach van Slyke. Ber. 5,66% $\text{NH}_2\text{-N}$. Gef. 5,64% $\text{NH}_2\text{-N}$.

4). *dl-Asparagyl-di-glycin*.

a. Fumaryl-di-glycin.

Das Fumaryl-di-glycin wurde nach Angabe von Fischer (1904) aus Glycin-äthylester durch Fumarierung und nachherige Abspaltung des Alkohols dargestellt.

b. Aminierung.

8 g Fumaryl-di-glycin wurden mit der 7 fachen Menge 28% Ammoniaks übergrossen und in einer Druckflasche bei 100°C erhitzt. Nach 4 stündigem Erhitzen gab eine herausgenommene Portion beim Ansäuern keinen Niederschlag mehr. Hierauf wurde das Ammoniak durch Vakuumdestillation ausgetrieben und der rückbleibende Sirup mit 20 ccm Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit n- AgNO_3 (berechnet auf den angewandten Fumaryl-körper) versetzt, der so erhaltene gelblichweisse voluminöse Nie-

derschlag auf Nutsche gesammelt und mit 80%igem Alkohol in dem Mörser verrieben und dann der Alkohol dekantiert. Nach mehrmaliger Wiederholung dieser Dekantierung wurde das Silbersalz im Exsiccator über H_2SO_4 im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 4,0 g.

Analyse: (bei 100°C unter 15 mm Druck 10 Stunden lang über P_2O_5 getrocknet).

0,1170 g Substanz verbrauchten nach Volhard, 10,03 ccm n/20 NH_4CNS . $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_6\text{N}_3\text{Ag}_2$ (461.2) Ber. 46,78% Ag.

Gef. 46,24% Ag.

3 g des Silbersalzes wurden unter Schütteln mit einer berechneten Menge n-HCl versetzt, und dass dabei entstandene Silberchlorid abfiltriert. Das Filtrat wurde mit n-Ammoniaklösung gegen Methylrot neutralisiert und bei niedriger Temperatur unter verminderten Druck bis zur Konsistenz des Sirup eingedampft und mit Alkohol versetzt. Dabei trat eine gelbweisse amorphe Masse auf. Die Alkoholische Schicht wurde abgegossen, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und wieder mit Alkohol gefällt. Dieses Verfahren wurde mehrmals wiederholt, und endlich der Rückstand im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Die Substanz war sehr leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und Äther. Ausbeute 1,5 g. Die Substanz sintert bei 95°C und schmilzt bei 145°C (unkorr.) unter Zersetzung.

Analyse: (Bei 100°C unter 15 mm Druck 24 Stunden lang über P_2O_5 getrocknet).

0,05 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 5,86 ccm n/10 H_2SO_4 . Für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}_3$ (247,1) Ber. 17,0% N. Gef. 16,24% N.

0,02 g Substanz lieferten 2,0 ccm $\text{NH}_2\text{-N}$ (26°C 755 mm) nach van Slyke. Ber. 5,66% $\text{NH}_2\text{-N}$. Gef. 5,48% $\text{NH}_2\text{-N}$.

5). *dl-Asparagyl-di-l-tyrosin.*

a. *Fumaryl-di-l-tyrosin.*

Fumaryl-di-l-tyrosinäthylester wurde durch Kuppelung des

Tyrosinäthylesterchlorhydrates mit Fumarylchlorid dargestellt. *l*-Tyrosin wurde aus Seide durch Hydrolyse mit Salzsäure hergestellt und nach Angabe Fischer's in Esterhydrochlorid verwandelt. 10 g *l*-Tyrosinäthylesterchlorhydrat wurden in 10 ccm Chloroform suspendiert und bei 0°C mit 20,5 ccm 2n-NaOH (1 mol.) Chloroform suspendiert und bei 0°C mit 20,5 ccm 2n-NaOH (1 mol.) unter kräftigem Schütteln versetzt. Der dabei frei gewordene Ester ging sofort in das Chloroform über. Hierauf wurde die Chloroformlösung von der wässerigen Schicht getrennt und unter Schütteln und Kühlen mit 1,6 g (1/4 mol.) Fumarylchlorid in 20 ccm Chloroform versetzt, und dazu nach 5 Minuten 1,1 g (1/4 mol.) Natriumkarbonat in 10 ccm Wasser hinzugefügt. Dann wurde zu der Mischung unter starker Schüttelung in 6 Portionen innerhalb einer Stunde abwechselnd die gleiche Menge Fumarylchloridchloroformlösung und 2,2 g (1/2 mol.) Natriumkarbonat, das in 25 ccm Wasser gelöst war, zugegeben. Dabei fiel das Kuppelungsprodukt als graulichweisse amorphe Masse aus. Dann wurde die Flüssigkeit abgesaugt. Um beigemengte anorganische Salze, Tyrosinäthylesterchlorhydrat und Fumarsäure zu entfernen, wurde das Kuppelungsprodukt mehrmals mit Chloroform, dann mit warmem Wasser (ca. 300 ccm) und zuletzt mit Äther gewaschen und über H_2SO_4 im Vakuum getrocknet. Es wurde dann in heissem Wasser gelöst. Beim Abkühlen schieden sich weisse nadelförmige Kristalle ab. Die Substanz löst sich leicht in Alkohol, schwer in Wasser. Sie schmilzt bei gegen 229°–230° (unkorr.) unter Zersetzung und Bräunung. Die Ausbeute betrug 5,0 g oder 50% der Theorie.

Analyse: (Bei 100°C unter 15 mm über P_2O_5 getrocknet).

0,14235 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 5,87 ccm n/10

H_2SO_4 . Für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{N}_2$ (498,26) Ber. 5,62% N. Gef. 5,77% N.

Zur Verseifung des Esters wurden 4,5 g bei Zimmertemperatur in 36 ccm n-NaOH (4 mol.) gelöst und nach 1/4 Stunde mit einer gleichen Menge n-HCl versetzt. Dabei fiel das Fumaryl-di-*l*-tyrosin als weisse nadelförmige Kristalle aus. Nach 1 stündigem Stehen in der Kälte wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Kristalle mit kaltem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen

und im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Die Ausbeute betrug 3,9 g, oder 97% der Theorie. Die Substanz schmilzt bei gegen 247° – 248°C (unkorr.) und ist schwerlöslich in Wasser.

Analyse: (Bei 100°C unter 17 mm über P_2O_5 getrocknet).

0,092 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 4,13 ccm n/10 H_2SO_4 . Für $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{N}_2$ (442,19) Ber. 6,33% N. Gef. 6,30% N.

b. Aminierung.

3,7 g Fumaryl-di-*l*-tyrosin wurden mit 26 ccm 28% Ammoniak in einer Druckflasche 3 Stunden auf 100°C erhitzt. Dabei ging der Fumarylkörper völlig in klare gelbliche Lösung über. Eine Probeportion davon gab beim Ansäuern keinen Niederschlag mehr. Die Lösung wurde durch Vakuumdestillation zum Sirup eingeeengt. Um gebundenes Ammoniak zu entfernen, wurde der Sirup in wenig Wasser aufgenommen, mit 1,2 mol. Bariumhydroxydlösung versetzt und unter vermindertem Druck bei niedriger Temperatur zur Trockene verdampft. Die Vakuumdestillation wurde bis zum völligen Verschwinden des Ammoniakgeruchs wiederholt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, das Barium genau mit H_2SO_4 gefällt, und erneut im Vakuum zu Sirup eingedampft. Er erstarrte nach 1 Tag langem Stehen im Eisschrank zu einer gelatinösen Masse. Diese wurde nach Absaugen in einer 10 fachen Menge heißen Wassers gelöst. Beim Abkühlen schieden sich feine nadelartige Kristalle ab. Die Ausbeute betrug 1,5 g, oder 39% der Theorie. Zur Analyse wurde die Substanz über P_2O_5 bei 100°C unter 15 mm Druck getrocknet.

Analyse:

0,05655 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl, 3,67 ccm n/10 H_2SO_4 ; für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{N}_3$ (459,2) Ber. 9,15% N. Gef. 9,10% N.

0,025 g Substanz lieferten 1,40 ccm $\text{NH}_2\text{-N}$ (27°C 752 mm) nach van Slyke. Ber. 3,05% $\text{NH}_2\text{-N}$. Gef. 3,04% $\text{NH}_2\text{-N}$.

Das Asparagyl-di-*l*-tyrosin schmilzt bei gegen 216° – 217°C (unkorr.) unter Zersetzung und Bräunung. Es löst sich schwer in kaltem, aber leicht in warmem Wasser.

FERMENTVERSUCHE.

1). *Einwirkung von Pepsin.*a. Glycyl-glycyl-*l*-asparagin.

0,13001 g Substanz wurden in 3 ccm Wasser gelöst, mit n-HCl bis zu Kongorot sauer versetzt, und dann 5 ccm m/10 Zitratpuffer und 10 ccm Fermentlösung (1% Pepsinlösung. Sankyo.) zugefügt, und weiter mit destilliertem Wasser auf 20 ccm verdünnt. Mit je 2 ccm Lösung wurde der Zuwachs an $\text{NH}_2\text{-N}$ nach van Slyke bestimmt. Ph 2,4. Nach 120 Stunden konnte ich keine Aufspaltung bemerken.

b. Glycyl-glycyl-*l*-asparaginsäure.

0,21371 g Substanz in 20 ccm gelöst. Bedingungen wie bei (a). Ph 2,1. Nach 120 Stunden konnte ich keine Aufspaltung bemerken.

c. Glycyl-*dl*-asparagyl-glycin.

0,11887 g Substanz in 20 ccm gelöst. Bedingungen wie bei (a). Ph 2,1. Nach 120 Stunden konnte ich keine Aufspaltung bemerken.

d. *dl*-Asparagyl-di-glycin.

0,07115 g Substanz in 20 ccm gelöst. Bedingungen wie bei (a). Ph 2,1. Nach 120 Stunden konnte ich keine Aufspaltung bemerken.

e. *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin.

0,0954 g Substanz in 10 ccm gelöst. Bedingungen wie bei (a). Ph 2,4. Nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

2). *Einwirkung von Papain.*a. Glycyl-glycyl-*l*-asparagin.

0,18425 g Substanz wurde in 3 ccm Wasser gelöst, mit n-NaOH zu Lakmus neutralisiert, dann mit 10 ccm Fermentlösung (3% Papainlösung, Merck, 2 Tage dialysiert) und mit 5 ccm m/10 Zitrat-

puffer (Ph 5,0) versetzt, sowie ferner mit destilliertem Wasser auf 20 ccm verdünnt. Die Hydrolyse wurde durch Bestimmung der Zunahme von $\text{NH}_2\text{-N}$ in je 2 ccm Lösung mit van Slyke's Methode verfolgt. Ph 5,1. Nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

b. Glycyl-glycyl-*l*-asparaginsäure.

0,1382 g Substanz in 20 ccm gelöst. Mischungsverhältnis gleich wie oben. Ph 5,1. Nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

c. Glycyl-*dl*-asparagyl-glycin.

0,10765 g Substanz in 20 ccm gelöst. Mischungsverhältnis gleich wie oben. Ph 5,0. Nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

d. *dl*-Asparagyl-di-glycin.

0,1142 g Substanz in 20 ccm gelöst. Mischungsverhältnis gleich wie oben. Ph 5,0. Nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

e. *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin.

0,09245 g Substanz in 10 ccm gelöst. Mischungsverhältnis gleich wie oben. Ph 4,6. Nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

3). *Einwirkung von Papain-HCN.*

a. Glycyl-glycyl-*l*-asparagin.

0,01855 g Substanz wurde in 5 ccm Wasser gelöst, dabei mit *n*-NaOH möglichst auf Ph 5,0 eingestellt, und dazu mit 10 ccm *m*/10 Zitratpuffer (Ph 5,0) und 5 ccm 1%iger Fermentlösung versetzt. Die Fermentlösung wurde vor dem Versuch wie üblich durch Blausäure 3 Stunden bei 37°C aktiviert. Zur Analyse wurde je 2 ccm dieser Lösung entnommen, und der Zuwachs an $\text{NH}_2\text{-N}$ nach van Slyke verfolgt. Ph 5,0. In 120 Stunden fand keine Hydrolyse statt.

b. Glycyl-glycyl-*l*-Asparaginsäure.

0,1191 g Substanz wurde in 20 ccm gelöst. Ph 4,9. In 120 Stunden keine Hydrolyse.

e. Glycyl-*dl*-asparagyl-glycin.

0,11379 g Substanz wurde in 20 ccm gelöst. Ph 4,9. In 120 Stunden keine Hydrolyse.

d. *dl*-Asparagyl-di-glycin.

0,09256 g Substanz wurde in 20 ccm gelöst. Ph 5,0. In 120 Stunden fand keine Hydrolyse statt.

e. *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin.

0,09163 g Substanz wurde in 10 ccm gelöst. Mischungsverhältnis gleich wie beim Versuch (a). Ph 5,0. In 120 Stunden fand keine Hydrolyse statt.

4). *Einwirkung von Erepsin.*

Die Erepsinlösung wurde nach Rice (1915) dargestellt.

a. Glycyl-glycyl-*l*-asparagin.

0,18762 g Substanz wurde in 3 ccm Wasser gelöst, mit n-NaOH möglichst auf Ph 7,8 eingestellt, dann mit 10 ccm m/10 Phosphatpuffer (Ph 7,8) versetzt und mit Wasser auf 15 ccm verdünnt. Die Lösung wurde bei 37°C aufbewahrt, und ihr 5 ccm vorerwärmter Fermentlösung zugesetzt.

Die Zunahme an $\text{NH}_2\text{-N}$ wurde nach van Slyke verfolgt. Zur Bestimmung wurden jedesmal 2 ccm der Lösung benutzt. Selbstverständlich zog ich den durch Kontrollversuch ohne Substrat gewonnenen Wert von dem des Hauptversuches ab. Ph wurde elektrometrisch bestimmt. Ph 7,9. (1 CO-NH Bindung=100% Spaltung).

Zeit in Stdn.	$\text{NH}_2\text{-N}$ in 2 ccm	Spaltung %
0	1,07 mg.	0
4	1,79 „	67
24	2,24 „	109
120	2,46 „	130

b. Glycyl-glycyl-*l*-asparaginsäure.

0,16726 g Substanz wurde in 20 cem gelöst in gleicher Weise wie beim Versuch (a). Ph 8,0.

Zeit in Stdn.	NH ₂ -N in 2 cem	Spaltung %
0	0,95 mg.	0
4	1,24 „	30
24	1,55 „	63
120	1,74 „	83

c. Glycyl-*dl*-asparagyl-glycin.

0,117 g Substanz wurde in 20 cem gelöst in gleicher Weise wie beim Versuch (a). Ph 8,0.

Zeit in Stdn.	NH ₂ -N in 2 cem	Spaltung %
0	0,66 mg.	0
4	0,67 „	1,5
24	0,78 „	18
120	1,03 „	56

d. *dl*-Asparagyl-di-glycin.

0,1034 g Substanz wurde in 20 cem gelöst in gleicher Weise wie beim Versuch (a). Ph 7,9.

Zeit in Stdn.	NH ₂ -N in 2 cem	Spaltung %
0	0,59 mg.	0
4	0,59 „	0
24	0,65 „	10
012	0,74 „	25

e. *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin.

0,0825 g Substanz wurde in 10 ccm gelöst in gleicher Weise wie beim Versuch (a). Ph 8,0. Die Lösung ergab nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

5). *Einwirkung von Trypsin.*

Als Trypsin wurde das Präparat von Grübler gebraucht. Dieses Trypsin spaltet Glycyl-asparagin nicht und auch, wie unten angegeben, kein in dem vorliegenden Experiment untersuchtes Tripeptid.

Es kann also als praktisch frei von Erepsin betrachtet werden. Als ich das Präparat auf Casein oder Kongorotfibrin wie üblich einwirken liess, bemerkte ich eine äusserst geringe Verdauung, aber wurde es mit der Enterokinaselösung vereinigt, zeigte es eine energische Wirkung auf diese Proteine. Die Zunahme der proteolytischen Kraft war dabei so gross, dass man das Präparat als beinahe frei von Enterokinase annehmen kann. Die Enterokinaselösung wurde nach Angabe von Waldschmidt-Leitz und Künstner (1927) aus getrocknetem Schweinedarmpulver hergestellt und mit Essigsäure und Sublimat gereinigt, und war frei von Srepsin.

a. Glycyl-glycyl-*l*-asparagin.

0,1368 g Substanz wurde in 3 ccm gelöst, mit n-NaOH gegen Lakmus neutralisiert, mit 10 ccm m/10 Phosphatpuffer (Ph 8,0) versetzt und mit destilliertem Wasser auf 15 ccm verdünnt im Thermostat bei 37°C aufbewahrt. Dann fügte ich 5 ccm vorerwärmter 1%iger Trypsinlösung zu. Zur Analyse nach van Slyke wurden je 2 ccm Lösung angewandt. Ph wurde elektrometrisch gemessen. Ph 7,9. Nach 120 Stunden keine Aufspaltung.

b. Glycyl-glycyl-*l*-asparaginsäure.

0,15926 g Substanz wurde in 20 ccm gelöst. Bedingungen wie oben. Ph 7,8. Nach 24 und 120 Stunden keine Aufspaltung.

c. Glycyl-*dl*-asparagyl-glycin.

0,07074 g Substanz wurde in 20 ccm gelöst. Bedingungen wie oben. Ph 7,6. Nach 24 und 120 Stunden keine Aufspaltung.

d. *dl*-Asparagyl-di-glycin.

0,07949 g Substanz wurde in 20 ccm gelöst. Bedingungen wie oben. Ph 8,0. Nach 24 Stunden keine Aufspaltung.

e. *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin.

0,0988 g Substanz wurde in 10 ccm gelöst. Bedingungen gleich wie oben. Ph 8,0. Nach 24 und selbst auch 120 Stunden keine Aufspaltung.

6). *Einwirkung von Trypsin-Kinase.*

Die Fermentlösung (4% Trypsinlösung) wurde vor dem Versuch mit dem Gleichen ihres Volumens erepsinfreier Kinaselösung gemischt und 1/2 Stunde bei 37°C aktiviert.

Die angewandte Fermentlösung war frei von ereptischer Wirkung.

a. *dl*-Asparagyl-di-glycin.

0,07027 g Substanz wurde in 4 ccm Wasser gelöst und mit 1 ccm n-NaOH versetzt; dann wurden 10 ccm m/10 Phosphatpuffer (Ph 8,3) und 5 ccm Fermentlösung zugesetzt. In je 2 ccm Lösung wurde der Zuwachs an $\text{NH}_2\text{-N}$ nach van Slyke bestimmt. Ph 8,3. Nach 24 Stunden keine Abspaltung.

b. *dl*-Asparagyl-di-*l*-tyrosin.

0,091 g Substanz wurde in 0,8 ccm n-NaOH gelöst, mit m/10 Phosphatpuffer (II Phosphat allein) auf 5 ccm verdünnt und bei 37°C aufbewahrt. Dazu fügte ich 5 ccm vorerwärmter Trypsin-Kinaselösung (Verhältn. 1:1). In je 2 ccm dieser Lösung wurde der Zuwachs an $\text{NH}_2\text{-N}$ nach van Slyke bestimmt. Ph wurde elektrometrisch bestimmt. Ph 8,83.

Zeit in Stdn.	NH ₂ -N in 2 cem	Spaltung %
0	0,577 mg.	0
24	0,664 „	15,0
48	0,717 „	24,2
120	0,887 „	53,8

7). *Einwirkung von Trypsin-Kinase auf dl-Asparagyl-di-l-tyrosin bei verschiedenem Ph.*

Der Versuch wurde ebenso wie beim oben beschriebenen Experiment angeordnet, abgesehen davon, dass je 0,1 g Substanz eingewogen und möglichst nach Bedarf mit n-NaOH und m/10 Phosphatpuffer (für Ph 9,1 Boratpuffer), der in variierendem Mischungsverhältnis gemischt war, auf jedem Ph eingestellt wurde. Dann wurde Ph elektrometrisch ermittelt.

Ph	7,11		7,76		8,33		9,16	
Zeit in Stdn.	NH ₂ -N Zuwachs	Spalt. %	NH ₂ -N Zuwachs	Spalt. %	NH ₂ -N Zuwachs	Spalt. %	NH ₂ -N Zuwachs	Spalt. %
0	0 mg.	0	0 mg.	0	0 mg.	0	0 mg.	0
24	0,03 „	5,0	0,10 „	16,7	0,11 „	18,3	0,03 „	5,0
48	0,08 „	13,3	0,16 „	26,6	0,18 „	30,0	0,08 „	13,3
120	0,31 „	51,7	0,40 „	66,7	0,46 „	76,6	0,30 „	50,0

8). *Isolierung von Proteinase und Carboxypolypeptidase.*

Diese zwei Fermente wurden nach Waldschmidt-Leitz und Purr (1929) wie folgend isoliert:

50 cem Trypsinlösung (5% Trypsinlösung) wurden bei Ph 7,0 mit je 3 cem Tonerdesuspension (C₇) 11 mal behandelt, das gesamte Adsorbat mit 20 cem 20% Glycerin gewaschen und mit 25 cem

0,04-n-NH₃ (20% Glycerin enthaltend) eluiert. Das Elut und die Adsorptionsrestlösung wurden als Fermentlösung nach der Aktivierung unter Zusatz von Kinaselösung (Verhältn. 1:1) und nach 1/2 Stunde langem Stehen bei 37°C gebraucht.

a. Einwirkung des Eluts.

0,03416 g Substanz wurde mit 0,06 ccm n-NaOH versetzt und mit m/10 Phosphatpuffer (Ph 8,3) auf 2 ccm verdünnt. Dazu fügte ich das Elut, das vorher mit der gleichen Menge Kinaselösung aktiviert wurde, hinzu. Je 1 ccm Lösung wurde entnommen, und der Zuwachs an NH₂-N nach van Slyke bestimmt.

Ein Kontroll Versuch ohne Substrat zeigte keinen Zuwachs des NH₂-N. Ph 8,3.

Zeit in Stdn.	NH ₂ -N in 2 ccm	Spaltung %
0	0,256 mg.	0
40	0,297 „	16,0

b. Einwirkung der Adsorptionsrestlösung.

0,032 g Substanz wurde in 2 ccm gelöst. Mischungsverhältnis gleich wie oben. Ph 8,4.

Zeit in Stdn.	NH ₂ -N in 2 ccm	Spaltung %
0	0,240 mg.	0
40	0,274 „	14,0

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Bahn, A. (1930): Fermentforsch., **11**, 399.
 Abderhalden, E. u. Schwab, E. (1928): Fermentforsch., **9**, 501.
 Abderhalden, E. u. Schwab, E. (1929): Fermentforsch., **10**, 305.
 Fischer, E. u. Abderhalden, E. (1905): J. f. physiol. Chem., **46**, 52.

- Fischer, E. u. Koenigs, E. (1904): B. d. dtsh. chem. Gesellsch., **37**, 4593.
- Nakashima, R. (1927): J. of Biochem., **7**, 399.
- Rice, F. E. (1915): J. Americ. chem. Soc., **37**, 1319.
- Waldschmidt-Leitz, E. u. Grassmann, W. u. Schlatter, H. (1927): B. d. dtsh. chem. Gesellsch. **60**, 1906.
- Waldschmidt-Leitz, E. u. Harteneck A. (1925): Z. f. physiol. Chem., **147**, 286. u. **149**, 203.
- Waldschmidt-Leitz, E., Klein, W. u. Schöffner, A. (1928): B. d. dtsh chem Gesellsch., **61**, 2092.
- Waldschmidt-Leitz, E. u. Künstner, G. (1927): Z. f. physiol. Chem., **171**, 300.
- Waldschmidt-Leitz, E. u. Purr, A. (1929): B. d. dtsh. chem. Gesellsch., **62**, 2217.
- Waldschmidt-Leitz, E., Schöffner, A., Schlatter, H. u. Klein, W. (1929): B. d. dtsh. chem. Gesellsch., **61**, 229.

STUDIES ON THE EFFECT OF METALS AND METAL SALTS ON MICROORGANISMS.

By

KUNIO TANAKA.

*(From the Bacteriological Institute, Tokio Imperial University.
Director: Prof. Matsujiro Takenouchi.)*

(Received for publication, December 13, 1930)

I. INTRODUCTION.

By the effort of many investigators it has been elucidated already that the bactericidal phenomena shown by many heavy metals and their salts can be interpreted as the effect of metal ions. The solution of more dissociable salt exerts its bactericidal effect much more readily than the solution of less dissociated salt of the same metal at the same concentration, and hardly oxidizable metal is quite inferior in its bactericidal effect to those easily oxidizable ones when they are placed in the culture media. As regards to the mechanism of this bactericidal effect, however, a divergence of opinions still prevails. To get a clearer insight in this respect the following experiments were undertaken.

II. THE BACTERICIDAL EFFECT OF VARIOUS SALT SOLUTIONS.

Salts examined in this experiment included gold chloride, silver nitrate, copper chloride, nickel chloride, cobalt chloride, ferric chloride, zinc chloride, all being preparates supplied by Merck.

Bacteria used in these experiments were Typhoid bacillus, *Bacterium coli commune*, *Staphylococcus pyogenes aureus*. Agar was used as a culture medium and, after twenty hours, 5 loops of bacteria were taken out and suspended into 1 cc. of distilled water.

The results are shown in table I-VIII and Fig. 1-2.

TABLE II. CdC_2 at 37°C .[illegible]TABLE III. NiCl_2 at 37°C .[illegible]

TABLE IV. CoCl_2 at 37°C .[illegible]TABLE V. ZnCl_2 at 37°C .[illegible]

TABLE VI. AgNO_3 at 18°C .

No.	Time	8 m	15	30	60	120	24 hr
	Concn.						
2 1	0.001 Mol.	—	—	—	—	—	—
	0.0005	—	—	—	—	—	—
3 4	0.00025	—	—	—	—	—	—
	0.0001	+	+	—	—	—	—
5 6	0.00005	+	+	—	—	—	—
	0.000025	+	+	—	—	—	—
7 8	0.00001	+	—	—	—	—	—
	0.000005	+	—	—	—	—	—
9 10	0.0000025	+	+	+	—	—	—
	0.000001	+	+	+	+	+	+
11 12	0.0000005	+	+	+	+	+	+
	0.00000005	+	+	+	+	+	+
13 14	0.0000001 0	+	+	+	+	+	+

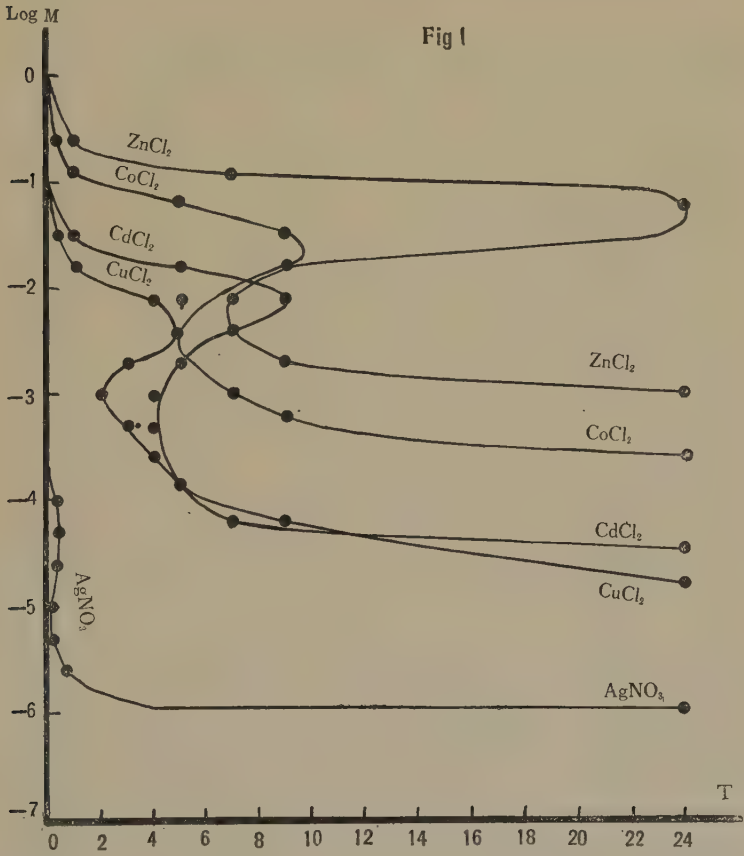
TABLE VII. FeCl_3 at 37°C .[illegible]

TABLE VIII. $AlCl_3$ at $37^\circ C$.

No.	Time. Concn.	15 m	30	1hr	2	3	4	5	7	9	24	48	72
1	1 Mol.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0.25	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0.12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0.06	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	0.03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7	0.015	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	0.008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	0.004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	0.002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	0.001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	0.0005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13	0.00025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14	0.00012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	0.00006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	0.00003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

As is clear from these tables and figures, the bactericidal effect increases with the concentration of the salt in lower concentration. However, when the concentration of salt reaches a certain value, the bactericidal action begins, in some salt solutions, to decrease with the increase of concentration. At a much higher concentration the bactericidal effect becomes more effective again.

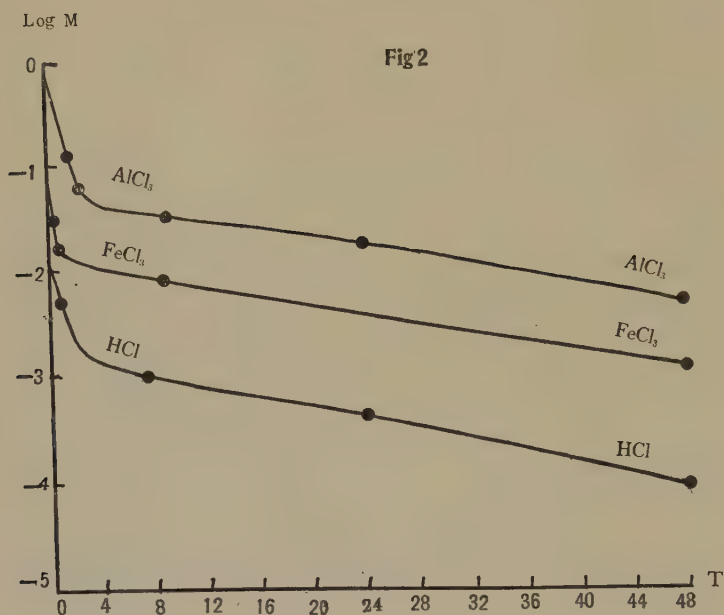
To elucidate the reason why these salt solutions exhibit a maximum and minimum in their bactericidal activity according to the change in the concentration of their solution, it is necessary to recall the fact that these salts show an acidic reaction in their solution by the hydrolytic process. Two points are, therefore, to be studied in their respect. The one is the effect of the acidity of



the solution on the bacterial existence ,and the other is the effect of the acidity on the bactericidal activity of the salt solution.

III. THE EFFECT OF ACIDITY UPON THE BACTERICIDAL
ACTIVITY OF THE SALT SOLUTION.

The effect of acidity upon the bactericidal activity of the salt solution was then studied by comparing results obtained by experiments in which the reaction of 0.0015 m. CuCl₂ solution was varied

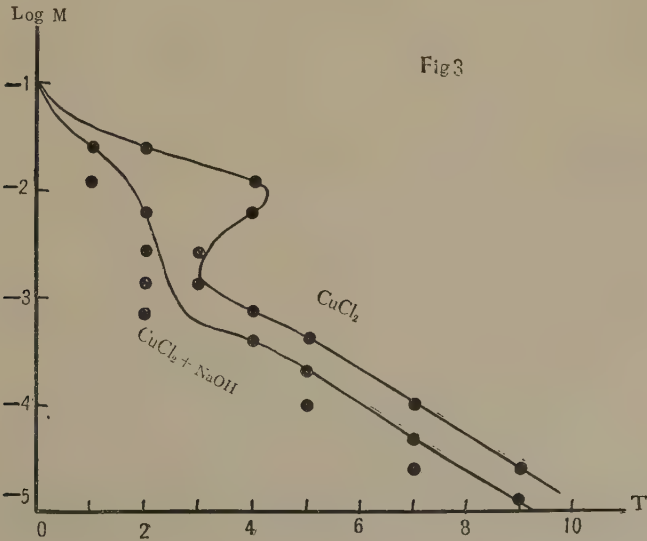


between pH 2.63 and 7.77 by the gradual addition of $n/20$ HCl or $n/20$ NaOH. The bacterium used was typhoid bacillus and the method of examining the bactericidal activity was the same as was mentioned in section II. Hydrogen ion concentration was measured colorimetrically by Clark and Lubs indicators. The results is shown in table IX.

As can be seen in the table, the bactericidal activity of 0.0015 m CuCl_2 solution is most effective in the acidity near pH 5. While at pH 4.65, where neither HCl nor NaOH was added, bacteria were not killed within 3 hours, the bactericidal effect was shown already at 2 hours. When the acidity increased up to pH 3.58, bacteria remained active even at 48 hours. The same ineffectiveness was shown at the acidity pH 7.77. That the ineffectiveness of copper salt at pH 7.77 is due to decrease of copper ion is obvious. How about the inability of copper salt pH 3.85?

TABLE IX.

No.	CuCl ₂	M($\frac{\text{HCl}}{20\text{NaOH}}$)	pH	1hr	2	3	4	5	6	8	24	48
1	0.0015 M	15 gtt HCl	2.63	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	"	13 "	2.75	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	"	9 "	2.86	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	"	5 "	3.15	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	"	3 "	3.26	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	"	2 "	3.58	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	"	1 "	3.89	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	"	0	4.65	+	+	+	-	-	-	-	-	-
9	"	1gt NaOH	4.86	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	"	2 "	5.12	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	"	3 "	5.43	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	"	5 "	7.08	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	"	7 "	7.77	+	+	+	-	-	-	-	-	-
14	0	0	6.16	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Before considering the effect of higher acidity on the bactericidal activity of copper salt at a constant concentration, the acidity of copper salt solution of various concentrations was determined. To each of these solutions a requisite amount of $n/20$ NaOH was added and the acidity of these solutions also was determined. The bactericidal effect was tested with all of these solutions, the results of which are shown in table X and figure 3.

As is clear from the table the smaller effectiveness of copper chloride at 0.012 m disappears whenever the acidity of the medium changes from pH 4.15 to pH 4.79, the more concentrated copper solution always being more active than the less concentrated one.

The same relation is seen also when we examine with cadmium chloride. The results, shown in table XI and figure 4, are clear without explanation.

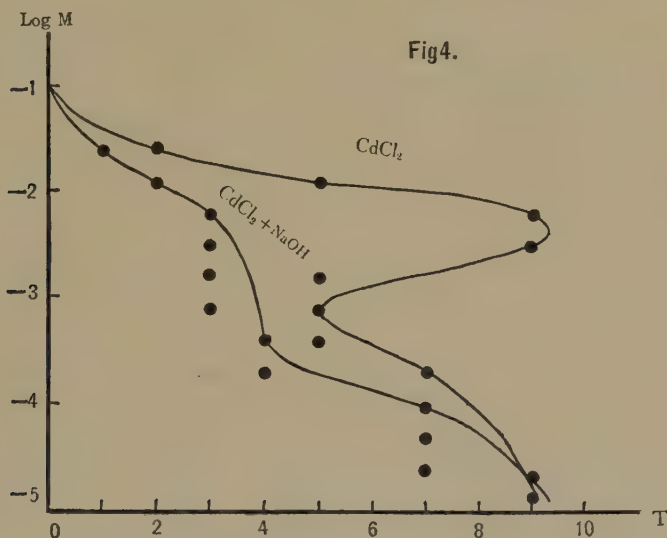
All of the above experiments, described in this section, suggest to us clearly that the bactericidal activity of metal ions begins to decrease whenever the acidity of the medium reaches to pH 4.5, either obtained by the addition of an acid or produced by the hydrolysis of salt itself. When we recall the fact that the isoelectric point of protein, composing the bacterial body, also lies at pH value, a little larger than pH 4.5, it seems to me quite plausible to suppose that the metal ion can only combine with bacteria only in the solution at the alkaline side of the isoelectric point of the bacterial body, and that, accordingly, at the acidic side the more concentrated salt solution becomes less active than the less concentrated solution at the alkaline side.

IV. THE BEHAVIOUR OF THE GRAM POSITIVE AND GRAM NEGATIVE BACTERIA AGAINST METAL SALT SOLUTION.

In the foregoing section, we have seen that the bacilli examined are killed by the addition of metallic salt solution of a certain concentration when the acidity of the solution does not exceed a definite

TABLE X

No.	Concent. of CuCl ₂	CuCl ₂ Only								NaOH added									
		pH	1 ^h	2	3	4	5	7	9	24	pH	1 ^h	2	3	4	5	7	9	24
1	0.1 M	3.60	-	-	-	-	-	-	-	-	4.05	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.05	3.84	-	-	-	-	-	-	-	-	4.10	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0.025	4.02	+	+	-	-	-	-	-	-	4.39	+	-	-	-	-	-	-	-
4	0.012	4.15	+	+	+	+	-	-	-	-	4.79	+	-	-	-	-	-	-	-
5	0.006	4.38	+	+	+	+	-	-	-	-	4.96	+	+	-	-	-	-	-	-
6	0.003	4.53	+	+	+	+	-	-	-	-	5.08	+	+	-	-	-	-	-	-
7	0.0015	4.65	+	+	+	+	+	-	-	-	5.23	+	+	-	-	-	-	-	-
8	0.0008	4.93	+	+	+	+	+	+	-	-	5.92	+	+	+	+	+	+	+	+
9	0.0004	5.15	+	+	+	+	+	+	+	-	6.02	+	+	+	+	+	+	+	+
10	0.0002	5.46	+	+	+	+	+	+	+	+	6.68	+	+	+	+	+	+	+	+
11	0.0001	5.73	+	+	+	+	+	+	+	+	7.08	+	+	+	+	+	+	+	+
12	0.000025		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
13	0.000025		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
14	0.000012		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
15	0	6.13	+	+	+	+	+	+	+	+	7.89	+	+	+	+	+	+	+	+



value, and that this may be explained by the combination of metallic cation with the protein constituent of the bacterial body. On the other hand, it has been brought into knowledge by many workers that the Gram positive bacterium is rich in lipid constituents, while the Gram negative bacterium is mainly of a proteinous nature. If this is the case, it would be interesting to know how these two bacteria groups behave themselves against the metal salts and it might bring us a little more understanding of the bactericidal action of metal salts.

As Gram negative bacteria, *B. coli* commune and typhoid bacillus were chosen, while *Staphylococcus pyogenes* albus was taken as a representative of Gram positive bacteria.

A. Comparison of acid- and alkali-resistance between Gram positive and Gram negative bacteria.

A series of hydrochloric acid and sodium hydroxide solutions of varying concentration were made, and, in 10 cc. of each of these solutions, 4 drops of *Staphylococci* or typhoid bacilli suspension

were added. After the lapse of 30 minutes, 1, 2, 3, 5, 7 and 24 hours, the life of added bacilli was tested by the method already mentioned. The results are shown in table XII.

As is clear from the table, Gram positive bacterium is more resistant against acid and less resistant against alkali than Gram negative bacterium.

B. Comparison of bactericidal activity of copper chloride in acidic or alkaline solution, between Gram positive and Gram negative bacteria.

In this experiment, the bactericidal activity of copper chloride solution at various concentrations against staphylococcus albus and B. coli commune was studied, and the change of activity upon the addition of acid or alkali was followed. Into 10 cc. of every salt solution of varying concentration either 2 drops of $n/20$ HCl or 2 drops of $n/20$ NaOH were added. The method of test remained the same. The result is shown in table XIII-XIV.

As will be seen from the tables, a difference between Gram positive and negative bacilli is clearly observable. Namely, while in Gram negative coli bacilli, the bactericidal activity of copper salt is inhibited by the addition of acid and promoted by the addition of alkali, entirely the reverse is observed in the case of Gram positive staphylococci. In the experiment with zinc chloride shown in table XIV, the addition of acid increases also the bactericidal activity of zinc chloride for staphylococci.

We are, however, entirely unable to explain why the bactericidal activity of copper chloride or zinc chloride against staphylococci is decreased by the addition of alkali. In so high a concentration of these solutions as was necessary to try against staphylococci, the bactericidal activity may also depend on some other factors too and a further study in this direction is desirable. For the present, I wish only to point out that the Gram positive staphylococci do not lose their resistance against copper salt when the acidity of the solution is lessened.

TABLE XII.

No.	Concentration	B. typhosus							No.	Staphilococcus p. albus.						
		30 ^m	1 ^h	2	3	5	7	24		3 ^m	1 ^h	2	3	5	7	24
1	0.1M (HCl)	-	-	-	-	-	-	-	1	+	-	-	-	-	-	-
2	0.05	-	-	-	-	-	-	-	2	+	+	-	-	-	-	-
3	0.01	-	-	-	-	-	-	-	3	+	+	-	-	-	-	-
4	0.005	+	+	-	-	-	-	-	4	+	+	+	-	-	-	-
5	0.001	+	+	+	+	+	+	-	5	+	+	+	+	+	+	+
6	0.0005	+	+	+	+	+	+	+	6	+	+	+	+	+	+	+
7	0.0001	+	+	+	+	+	+	+	7	+	+	+	+	+	+	+
8	0.00005	+	+	+	+	+	+	+	8	+	+	+	+	+	+	+
9	0.00001	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+	+	+	+	+	+
10	0.000005	+	+	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	+	+	+
11	0.000001	+	+	+	+	+	+	+	11	+	+	+	+	+	+	+
12	0	+	+	+	+	+	+	+	12	+	+	+	+	+	+	+
13	0.00001 (NaOH)	+	+	+	+	+	+	+	18	+	+	+	+	+	+	+
14	0.000005	+	+	+	+	+	+	+	14	+	+	+	+	+	+	+
15	0.00001	+	+	+	+	+	+	+	15	+	+	+	+	+	+	+
16	0.00005	+	+	+	+	+	+	+	16	+	+	+	+	+	+	+
17	0.0001	+	+	+	+	+	+	+	17	+	+	+	+	+	+	+
18	0.0005	+	+	+	+	+	+	-	18	+	+	+	-	-	-	-
19	0.001	+	+	+	+	+	-	-	19	+	+	-	-	-	-	-
20	0.005	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-
21	0.01	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-	-
22	0.05	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-	-	-	-	-	-
23	0.1	-	-	-	-	-	-	-	23	-	-	-	-	-	-	-

TABLE XIV.

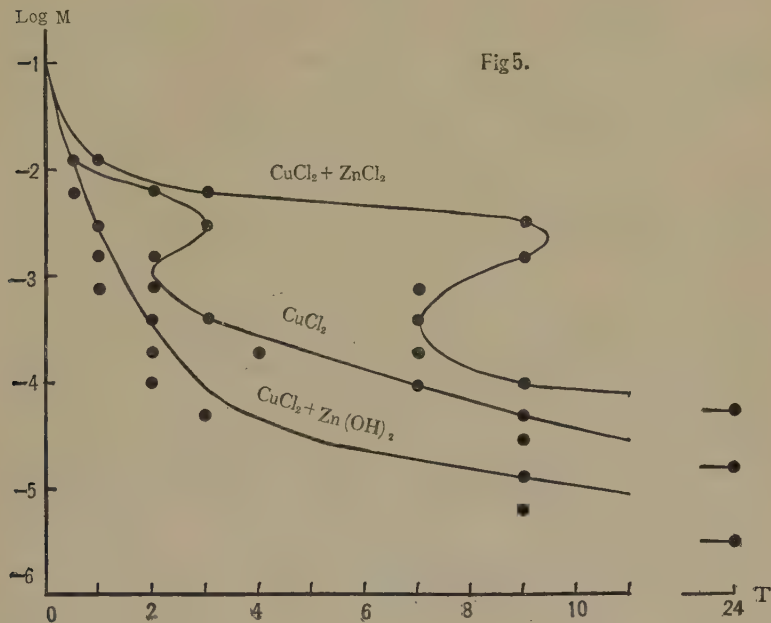
[illegible]

V. THE EFFECT OF THE ADDITION OF METALS, THE ELECTROLYTIC
SOLUTION TENSION OF WHICH IS LARGER THAN COPPER,
TO THE COPPER SALT, ON THE BACTERICIDAL
ACTIVITY OF THE LATTER.

In 1926, Kuroya made an observation that the bactericidal activity of copper chloride, hydrochloric acid and lead nitrate against typhoid bacillus and *B. coli* commune is increased upon the addition of zinc dust or magnesium powder and made a queer assumption that this increase of activity is due to the liberation of copper or lead as metal. His reasoning in his paper seems, however, quite untenable. He neglected entirely the effect of the change of acidity of the medium produced by the addition of zinc or magnesium. It is obvious that in his case the acidity of the solution was lowered when zinc or magnesium was added to the copper solution. Too much excess of metals may indeed cause the reaction of the solution of alkaline and the change of bactericidal activity of the system will be influenced by the amount of lighter metal added.

To prove that his assumption is entirely false, we performed an experiment in which the bactericidal activity of copper chloride at various concentrations was tested upon the addition, either of 5/1000 m ZnCl_2 , or of a saturated solution of $\text{Zn}(\text{OH})_2$. The bacterium used was typhoid bacillus. The result is shown in table XVI and figure 5.

As can be seen from table XVI and figure 5 the bactericidal activity of copper salt solution is increased upon the addition of zinc hydroxide, while the addition of zinc chloride, on the contrary, induces decrease in the bactericidal activity of copper salt solution. The increase of bactericidal activity is due to the lowering of acidity caused by the addition of zinc hydroxide, while the decrease of activity is due to the increase of acidity of the solution caused by the addition of acidic solution of zinc chloride.



VI. THE EFFECT OF METAL SALT SOLUTION ON THE AGGLUTINATION OF BACTERIA.

Since Nicolle studied, in 1898, the agglutinating action of salt solution on bacteria, many experiments have been tried by various workers with the results that salts, consisting of bivalent or trivalent cation, show the maximum of agglutination of the bacteria at a certain concentration, the more concentrated solution being less effective.

When the concentration of salts is increased much more the agglutination occurs again. This phenomenon, which is called Neisser and Friedmann's irregular series, can possibly be explained by the change of acidity of the medium according to the difference in the concentration of the salt just is the case in regards to bactericidal activity. I have therefore studied the agglutinating

force of the solution of several metal salts at various concentrations, and examined also the mode of change in agglutinating force when the acidity of the medium was lowered or elevated by the addition of NaOH or HCl. The results are shown in Tables XVII–XVIII.

It is clear from these tables that the agglutination of bacteria by the heavy metal salts is prevented when the increase of the salt concentration induces, by their own hydrolysis, an increase of acidity much more than the isoelectric point of bacterial protein.

The table shows also the fact that the agglutination may occur at pH 4.15 in case of copper, while the agglutination does not occur at pH 4.733 in case of CdCl_2 and at pH 4.74 in case of ZnCl_2 . Ions of metal, the electrolytic solution tension of which is lower than hydrogen, can get into congruence with hydrogen ion, while the more positive ions are unable to do so. It may be interesting also to study this relation in the case of Gram positive bacteria.

SUMMARY.

1. The bactericidal and agglutinating action of metal salt on bacteria is dependent on the reaction of the medium. When acidity of the medium is larger than the isoelectric point of bacterial protein, the bactericidal activity of metal ion is lost, while too much alkaline reaction precipitates the metal ion as hydroxide and may also cause the decrease of activity. At a definite acidity of the medium only, the bactericidal activity of metal salts is proportional to their concentration.

2. The irregular series seen in case of agglutinating and bactericidal action of salts may be explained by the increase of acidity produced by the hydrolysis of salts themselves.

3. The bactericidal activity of more positive metal ions like zinc and lead are influenced at a much lower acidity than those of less positive metal ions like copper.

4. The bactericidal activity of active metal salt is increased by the addition of metal, which is more positive than that which constitutes the salt, only when it produces a favourable condition

TABLE XVII.

No.	Concentra- tion of salts	CuCl ₂			CdCl ₂			ZnCl ₂			HCl	
		pH	Agglu	NaOH added pH	Agglu	pH	Agglu	Agglu	pH	NaOH Added pH	Agglu	pH
1	2.0 Mol											
2	1.0											
3	0.5											
4	0.25											
5	0.10	3.60	—	4.05	+	4.38	—	+	4.74	6.02	—	—
6	0.05	3.84	—	4.12	+	4.51	—	+	4.96	6.32	—	—
7	0.025	4.02	—	4.39	+	4.73	—	+	5.17	6.58	—	—
8	0.012	4.15	+	4.79	+	4.85	+	+	5.44	6.61	—	—
9	0.006	4.38	+	4.96	+	5.13	+	+	5.72	6.81	—	—
10	0.003	4.53	+	5.08	+	5.26	+	+	5.94	7.08	—	—
11	0.0015	4.65	+	5.23	+	5.45	+	+	6.08	7.20	—	—
12	0.0008	4.93	+	5.92	+	5.59	—	—			2.95	+
13	0.0004	5.15	+	6.02	+	5.77	—	—			3.15	+
14	0.0002	5.46	—	6.68	—	5.93	—	—			3.51	+
15	0.0001	5.73	—	7.82	—	6.10	—	—			3.81	—
16	0.00005		—		—		—	—			4.10	—
17	0.000025		—		—		—	—				—
18	0.000012		—		—		—	—				—
19	0.000060		—		—		—	—				—
20	0.000003		—		—		—	—				—
21	0.000015		—		—		—	—				—
22	0		—		—	6.12	—	—	6.12			6.12

in the acidity of the medium for the action of the active metal ion.

5. Gram positive bacillus seems less sensitive to the change of acidity of the medium in its behavior against the bactericidal action of metal salts.

REFERENCES.

- Cohn (1922): A. J. Bact., 7, 183.
Eisenberg (1919): Cent. Bakt. I. Org., 82, 69.
Hatchkiss (1923): A. J. Bact., 8, 141.
Joachimoglu (1923): Bioch. Zeitschr., 134, 489.
Kuroya (1926): Japanese J. exp. medicine, 10, 347.
Neisser u. Friedmann (1904): M. Med. Wochenschr., 51, 465.
Nicolle (1989): Ann. pasteur., 14, 161.

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER HÄMOGLYKOLYSE DURCH DIE NAHRUNG, MIT BESONDERER BERÜCK- SICHTIGUNG DER AVITAMINOTISCHEN DIÄT.

I. Mitteilung.

Über den Einfluss des Cholesterins und des Lecithins auf die Hämoglykolyse.

VON

YOSHIKANE KAWASHIMA UND JINJI CHIWAKI.

*(Aus der inneren Klinik der medizinischen Akademie der Nihon-Daigaku,
Tokyo. Vorstand: Prof. Dr. Z. Hatt a.)*

(Eingegangen am. 1. Dezember 1930)

I. EINLEITUNG.

Es ist schon von mehreren Autoren (Doyon u. Morel 1903, Lépine u. Boulud 1907, Rona u. Döblin 1911, Milne u. Peter 1912, Macleod 1913, K. Yada 1921, C. Aibara 1922, Y. Kawashima 1922 etc.) klar gestellt, dass die glykolytische Kraft des Blutes nur in seinen Formelementen, Erythrozyten, Leukozyten und Blutplättchen, enthalten ist. Kawashima (1922) behauptet, dass die Erythrozyten dabei eine stärkere Glykolyse entfalten als die anderen Zellen, weil sie an Zahl dieselben deutlich übertreffen, wenn sie auch im Vergleich mit jeder einzelnen Zelle glykolytisch schwächer sind. Nach Takemoto (1927) nimmt die zuckerzerstörende Kraft des Blutes der mit poliertem Reis gefütterten Hühner, d. h. bei der Avitaminose, deutlich ab. Eine weitere Erforschung dieser hemmenden Hämoglykolyse bei der Avitaminose und eine Entscheidung, ob ein Unterschied zwischen den kernhaltigen Hühner- und kernlosen Kaninchenerythrozyten erkennbar ist, schien uns von Interesse. Hierzu unternahmen wir Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Nahrung,

insbesondere der vitaminfreien, auf die Hämoglykolyse. Zunächst wurden jedoch aus dem folgenden Grunde Cholesterin und Lecithin als Versuchsmaterial ausgewählt: Das Cholesterin ist bekanntlich ein wichtiger Bestandteil des Blutkörperchens und spielt bei der Erhaltung einer bestimmten Oberflächenspannung und elektrischen Ladung der Blutzelle eine grosse Rolle. Dadurch reguliert es auch die Stoffverschiebungen durch die Zellmembran; es wirkt auf diese härtend, und bei der Hämolyse mit den verschiedenartigen chemischen Substanzen, Bakterien-, Parasiten-, und Schlangengiften etc. hemmend, während das Lecithin gerade gegenteilige Wirkung zeigt. Bei der Reiskrankheit resp. Avitaminose ist die Abnahme des oxydativen Vorgangs im Körper, d. h. des Grundumsatzes, der CO_2 -Bildung und der O_2 -Aufnahme der Orgazellen, kurzgesagt eine Störung des Kohlehydratstoffwechsels, experimentell nachgewiesen worden. Der Lipoidstoffwechsel erleidet dabei auch eine Störung; nach Kodama (1925), Hotta (1924), Lawaczek (1923) u. Asada (1923, 1924) u. a. nimmt das Cholesterin im Blute des Vogels bei der Reiskrankheit zu, während das Lecithin dabei abnimmt. Nach Hotta treten die Beri-Beri-Symptome schneller in Erscheinung, wenn man die Taube mit Reis und Cholesterin füttert als beim Reis allein. Lawaczek (1924) hat noch einen Versuch gemacht, in welchem er einen hemmenden Einfluss des Cholesterins auf den O_2 -Verbrauch des Lecithins bestätigt hat, indem Tauben die Emulsionen von beiden Substanzen in verschiedenem Mengenverhältnis gegeben wurden. Daraus kann man wohl vermuten, dass diese Substanzen auch bei dem Stoffwechsel der Reiskrankheit antagonistisch wirken. Nach den Versuchen von Takayama (1925), Takemoto (1927) und Funk (1914) erhöht sich der Zuckergehalt des Blutes bei dieser Krankheit. Durch Cholesteringabe per os steigt die Kurve des Blutzuckers an (Sakurai 1926, 1930). Im Folgenden berichten wir nun die Ergebnisse unserer Versuche über die Beziehungen der Lipoide zur Glykolyse des Blutes.

II. UNTERSUCHUNGSMETHODE.

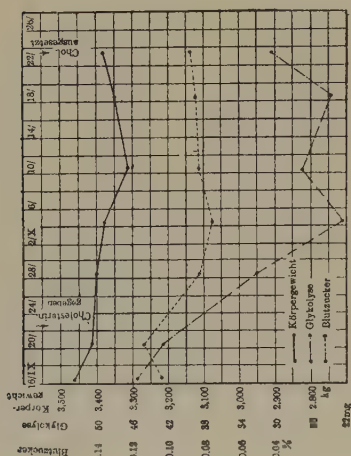
In der Kontrollzeit wurde das Kaninchen mit einem bestimmten Futter (Tōfukasu, einem Rückstand des Bohnenquarks mit einer geringen Menge Komatsuna, einer Art von Gemüse, und Mohrrüben) 100 g pro Kilo Körpergewicht gefüttert, und dabei die glykolytische Kraft des Blutes des Tiers 2–3 mal in einem Intervall von einer Woche untersucht. In der Versuchszeit wurde dann das Cholesterin oder Lecithin (Merk) in der Menge von 0,5–1,0 g pro Kilo Körpergewicht zum Futter hinzugefügt, und wieder die Glykolyse des Blutes und auch der Cholesteringehalt desselben meistens einmal wöchentlich bestimmt, weil wir berücksichtigten, dass zu häufige Blutentnahme irgend einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse ausüben könnte. Zugleich haben wir noch in nüchternem Zustand den Blutzucker und das Körpergewicht des Versuchstiers bestimmt. Die Resultate in der Kontroll- und Versuchszeit wurden dann miteinander kollationiert. Das aus der Ohrvene entnommene Blut wurde defibriniert, durch Gaze filtriert und mit einer kleinen Menge 10%iger Traubenzuckerlösung versetzt. Dann wurde das Blut zur Verrichtung der glykolytischen Wirkung bei 37°C. in den Brutschrank gestellt. Zur Zuckerbestimmung bedienten wir uns des Mikroverfahrens von Bang. Die Grösse der glykolytischen Kraft bezeichneten wir nach der Abnahme der Zuckermenge durch 1 Million Erythrozyten und gebrauchten diese Zuckermenge zum Vergleich der Proben miteinander, wie es Kawashima (1922) schon bei seiner früheren Arbeit gemacht hatte. Kawashima hat dabei auch experimentell nachgewiesen, dass die Leukozyten, die dem defibrinierten Blute in geringer Anzahl beigemischt sind, eine kaum erkennbare Glykolyse verrichten und deshalb für die Versuchsergebnisse ohne Belang sind. Natürlich wurde die Bakterienfreiheit stets durch ärobe und anärobe Kultur am Ende jedes Versuchs sichergestellt. Zur Feststellung des Cholesteringehaltes wurde die Methode von Bernhardt befolgt, nach welcher die Gesamtmenge des Cholesterins im Vollblut und Blutplasma

bestimmt, und zugleich in den Blutzellen aus dem Volumenverhältnisse zwischen dem Blutplasma und den Blutzellen berechnet wurde.

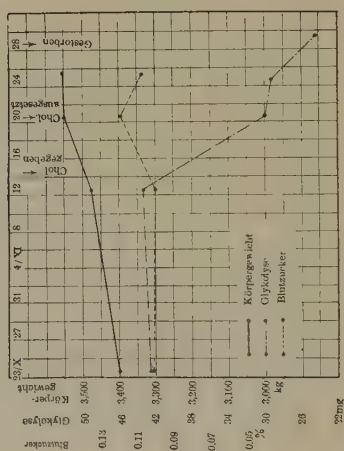
III. VERSUCHE MIT CHOLESTERINZUSATZ ZUM FUTTER.

Wie schon Kawashima (1922) zeigte, dauert die Hämoglykolyse des Kaninchens 24 Stunden lang; danach ist fast keine oder nur eine spurweise zu beobachten. Fast dasselbe gilt auch wie später erwähnt wird bei dem Cholesterinblute, weshalb wir hier zur Beurteilung der Versuchsergebnisse eine glykolytische Kraft von 24 Stunden verwenden.

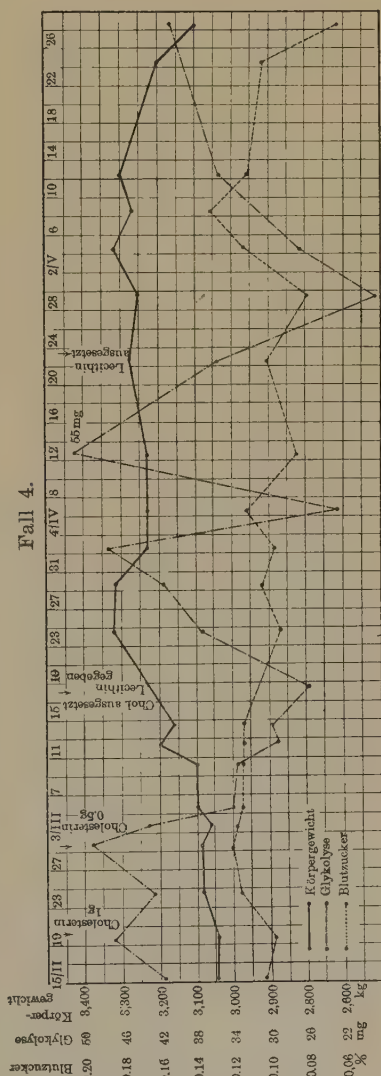
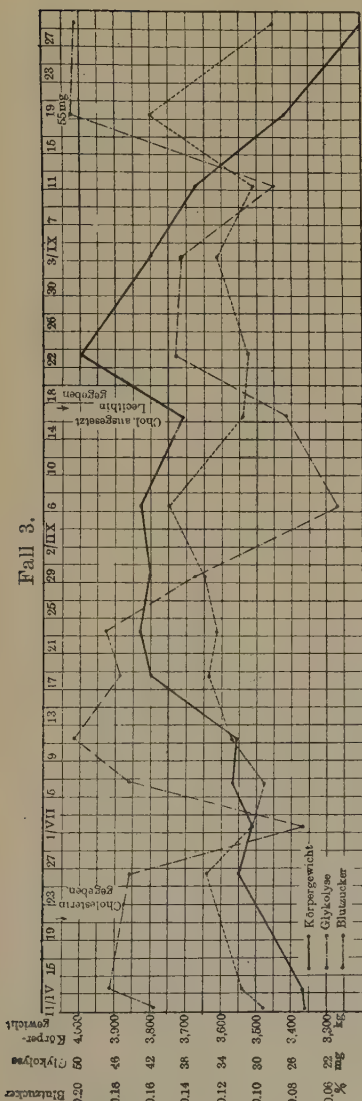
Fall 1.



Fall 2.



Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass die glykolytische Kraft in der Kontrollzeit eine geringe Schwankung von 2–10% zeigt. Bei der Cholesterinfütterung, täglich 1 g pro Kilo Körpergewicht gegeben, zeigt die Glykolyse beim ersten Fall schon nach einer Woche eine deutliche Abnahme von 27,4% im Verhältnis zu der in der Kontrollzeit, und nach zwei Wochen eine Abnahme von 49,8% (48% selbst im Vergleich mit der geringsten Glykolyse in der Kon-



Fall 2. (Kaninchen Nr. 2, ♂).

Kontrolle	23. X.	3,400	101	558	368	190	34,2	42,3	4,520	169	110	259	Seit 14. XI. 1g Cholesterin pro kg Körpergewicht per os gegeben. Am 20. XI. Cholesterin ausgesetzt, insgesamt 7g Cholesterin pro kg Körpergewicht gegeben.
	12. XI.	3,480	100	436	224	212	48,6	41,4	5,110	174	120	255	
Versuch	20. XI.	3,550	119	401	202	199	49,6	30,2	6,600				Am 27. X. Kreuzversuch. Am 28. X. morgens tot gefunden.
	25. XI.	3,550	107	436	282	154	35,3	27,2	5,660	615	800	375	
	27. XI.			510	378	132	25,9	24,1	5,472				

Fall 3. (Kaninchen Nr. 3, ♂).

Kontrolle	15. II.	3,040	102	540	319	229	42,4	41,6	5,504	86	47	151	Seit 20. II. 1g Cholesterin pro kg Körpergewicht per os gegeben. Seit I/III 0,5g Cholesterin pro kg Körpergewicht gegeben.
	19. II.	3,045	98	535	269	266	49,7	47,0	5,664	5500			
Versuch	24. II.	3,085	116	538	304	234	43,5	42,5	5,504	750	600	983	
	I. III.	3,090	121	487	224	263	54,0	49,2	5,344	3400			
	III.	3,060	118	495	264	232	46,9	43,1	5,376	3600	811	858	
	5 I.	3,100	115	386	196	194	50,0	34,0	5,728	6300		741	

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg%	Zucker- gehalt in mg%		Zucker- abnahme				Erythrozyten (Mill.)	Leucozyten	Cholesterin- gehalt in mg%			Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn.	in mg	in %	zu 1×10^6 Mill Erythrozyten	Vollblut			Blutplasma	Blutkörper- chen		
10. III.	3,100	115	425	253	172	40,5	31,6	5,440	5200				am 18. III. Kreuzversuch. Seit 18. III. Cholesterin ausgesetzt und seit 20. III. Lecithin gegeben, insge- samt 16,5g Cholesterin pro kg Körper- gewicht gegeben. Cholesteringehalt am 26. III. bestimmt.	
12. III.	3,200	99	370	197	173	46,6	29,4	5,856	5600					
14. III.	3,160	114	455	300	155	34,0	29,9	5,184	6400					
18. III.			408	272	136	33,3	25,9	5,400						
24. III.	3,330	94	424	236	188	44,3	37,2	5,056	7600					
29. III.	3,320	106	387	146	241	62,3	40,8	4,992	6400	900	1125	578		
2. IV.	3,230	99	353	144	210	59,5	47,4	4,428	4600	276				
6. IV.	3,230	113	338	217	121	35,8	22,7	5,312	5200	818				
12. IV.	3,230	86	564	228	336	59,5	55,0	6,080	5000				Seit 23. IV. Lecithin ausgesetzt, Die Gesamtmenge des Lecithins beträgt 34g pro kg Körpergewicht.	
22. IV.	3,270	101	280	97	183	65,4	35,9	5,120	4600	429				
29. IV.	3,250	80	489	376	113	23,1	18,3	6,172						
Versuch														

Versuch

Versuch	4. V.	3,320	113	399	240	159	39,8	26,3	6,048				
8. V.	3,270	131	374	158	216	57,7	37,0	5,824					
12. V.	3,300	111	363	154	209	57,5	35,8	5,824		357	333	423	Nach Aufhören des Versuchs lebte das Tier lange Zeit und ging schliesslich zu Grunde.
24. V.	3,200	104	473	236	237	50,0	39,6	5,984					
28. V.	3,100	62	411	176	235	57,1	40,7	5,760					

Fall 4. (Kaninchen Nr. 7 ♂).

Kontrolle	11. VI.	3,360	96	390	105	264	62,5	41,6	6,336				
	13. VI.	3,365	109	491	217	274	55,8	4,67	5,810	85	69	110	
	26. VI.	3,550	129	502	215	289	56,8	44,2	6,720	750			Seit 21. VI. 1g Cholesterin pro kg Körpergewicht per os gegeben.
	1. VII.	3,510	102	467	323	144	30,8	24,7	5,840				
	6. VII.	3,570	96	526	254	272	51,7	44,1	6,166				
	11. VII.	3,560	114	444	79	365	82,2	57,0	6,400				
	18. VII.	3,800	128	458	176	282	52,1	45,3	6,240	6000			

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg%	Zucker- gehalt in mg%		Zucker- abnahme			Erythrozyten (Mill.)	Leukozyten	Cholesterin- gehalt in mg%			Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn.	in mg	in %	zu 1×10^6 Mill Erythrozyten			Vollblut	Blutplasma	Blutkörper- chen	
23. VII.	3,800	123	463	171	292	63,0	47,0	6,200	6000				Am 16. VIII. Kreuzversuch Seit 17. VIII. Cholesterin ausgesetzt, die Gesamtmenge des Cholesterins beträgt 57 g pro kg Körpergewicht. Seit 17. VIII. 1g. Lecithin pro kg Körpergewicht gegeben. Am 20. IX. Lecithin ausgesetzt, insges- amt Lecithin 44g pro kg Körpergewicht. Nach Aufhören des Versuchs lebte das Tier lange Zeit
29. VII.	3,800	130	455	231	224	48,3	36,9	5,952	11600				
6. VIII.	3,830	151	436	310	126	28,9	20,6	6,112	6400				
16. VIII.	3,740	109	557	410	147	26,4	26,7	5,504					
23. VIII.	4,000	105	406	181	225	55,4	39,1	5,760	6600				
3. IX.	3,800	121	398	158	240	60,3	38,4	6,240	6000	909	1071	319	
11. IX.	3,680	102	382	274	108	26,7	28,0	3,840	6200				
19. IX.	3,420	160	453	150	303	66,9	55,0	5,500	4000	750			
29. IX.	3,160	91	356	97	219	58,7	50,7	4,325	3000				

Versuch

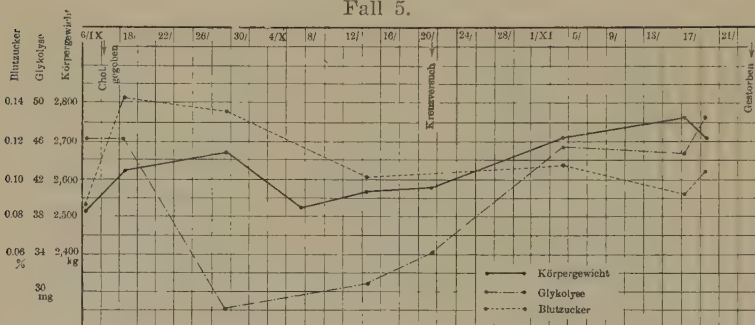
Fall 5. (Kaninchen Nr. 13, ♂).

Kontroll	Versuch												
6. IX.	2,510	87	444	156	288	64,7	46,5	6,150	4200	87	111	162	Seit 11. IX. 1g Cholesterin pro kg Körpergewicht per os gegeben.
18. IX.	2,620	142	378	93	285	75,4	46,3	6,146	5000	341	500	109	
29. IX.	2,670	136	424	236	188	44,3	28,2	6,652	4200	888	1000	691	
14. X.	2,570	102	395	197	198	50,0	30,9	6,400	4000				
21. X.	2,580		573	354	219	38,2	34,2	6,400					Am 21. X. Kreuzversuch.
4. XI.	2,715	109	533	292	241	45,2	45,6	5,280					
17. XI.	2,770	91	371	116	255	66,0	44,5	5,720					
19. XI.	{ 2,710	114	405	118	287	70,9	48,5	5,928					
			410	128	282	68,9	47,6	5,928	Zucker nach Haemolyse bestimmt.				
													Am 24. XI. morgens tot gefunden.

Seit 11. IX. 1g Cholesterin pro kg
Körpergewicht per os gegeben.

Am 21. X. Kreuzversuch.

Fall 5.



trollzeit). Dabei ist der Cholesteringehalt im Vollblut fünf mal, im Plasma etwa 10 mal und in den Blutzellen nur 1,5 mal grösser als normal. Beim zweiten Fall nimmt die Glykolyse am 7. Tage des Versuchs an Kraft um 27,9% im Vergleich mit der durchschnittlichen Glykolyse in der Kontrollzeit ab. Hier wurde dann die Cholesteringabe unterbrochen, aber noch fünf Tage danach erholte die Glykolyse sich nicht; sie zeigt vielmehr eine Abnahme von 35%. Der Cholesteringehalt hatte im Blute noch eine etwa 7 fache Grösse, in den Zellen eine etwa 1,5 fache. Am 8. Tage nach der Aussetzung der Cholesteringabe zeigte das Blut noch eine deutlich schwächere Glykolyse als die der Norm, und am nächsten Tage ist das Kaninchen gestorben. Beim Kaninchen Nr. 3, dem anfangs 9 Tage 1,0 g Cholesterin pro Kilo Körpergewicht, später aber 0,5 g gegeben wurde, erfährt die glykolytische Kraft am 5. Tage nach der Cholesteringabe fast keine Veränderung, während der Cholesteringehalt dabei im Vollblut ca. 7 mal, im Plasma 12 mal und in den Zellen über 6 mal grösser als normal geworden ist. Am 12. Tage, an dem der Cholesteringehalt im Vollblut etwa 10 fach, im Plasma 18 fach und in den Blutzellen 5 fach grösser als normal ist, hat die glykolytische Kraft noch einen normalen Wert. Sie zeigt erst nach zwei Wochen eine Abnahme von 23,3%, am 19. Tage 28,7%, am 21. 33,6%, am 23. 32,5% und am 27. 41,5%; dazwischen wurden im ganzen 16,5 g Cholesterin pro Kilo Körpergewicht

gegeben. Bei diesem Fall tritt die Abnahme der Glykolyse, im Gegensatz zu den beiden vorigen Fällen, sehr langsam in Erscheinung, obwohl vom Cholesterin nur halb so viel gegeben wurde. Dann wird nach der Cholesterinaussetzung 1,0 g Lecithin pro Kilo Körpergewicht verabfolgt, und schon 5 Tage danach erholt die Glykolyse sich, nur eine Abnahme von 16% zeigend. Nach 10 Tagen erreicht sie einen fast normalen Wert und nach zwei Wochen einen ganz normalen, der auch am 24. Tage gleich bleibt. Am 7. Tage nach der Lecithinfütterung zeigt der Cholesteringehalt in Vollblut und Plasma noch keine deutliche Abnahme, dagegen in den Blutzellen eine ziemlich bedeutende. Nach zwei Wochen, während deren die abgeschwächte Glykolyse sich ganz normal erholt, kommt der Cholesteringehalt im Vollblut auch zur Abnahme. Nach 18 Tagen, und einer vorübergehenden Abschwächung der erhaltenen Glykolyse nimmt die Cholesterinmenge im Blute wieder zu. Ob diese Tatsache aber zufällig ist oder irgend eine Beziehung zwischen dem Cholesteringehalt und der Glykolyse im Blute anzeigt, darüber kann man ohne weiteres nichts Sicheres sagen. Nun wird die Lecithingabe unterbrochen; und am 7. Tage danach zeigt die Glykolyse dem Grade nach eine 58,6%ige, am 12. eine 40,6%ige, am 16. eine 16,4%ige und am 20. eine 19,0%ige Abnahme im Vergleich zu der im normalen Zustand. Am 31. u. 35. Tage besitzt sie aber normale Kraft. Der Cholesteringehalt beträgt am 20. Tage nach der Lecithinaussetzung etwa die Hälfte im Verhältnis zu dem bei der Cholesteringabe, ist jedoch 3 fach so gross als der in der Kontrollzeit. Danach kommt dieses Kaninchen allmählich in seinen früheren gesunden Zustand und lebt noch lange Zeit weiter. Beim Fall 4 (Kaninchen Nr. 7) erleidet die Glykolyse am 6. Tage nach der Cholesteringabe noch keine Veränderung, während der Cholesteringehalt im Blute dabei schon bis zu etwa 9 facher Grösse zunimmt. Am 11. Versuchstage zeigt sie aber eine Abschwächung von 41,9%. Danach erholt sie sich bis zur normalen Kraft und zeigt bei der Untersuchung am 47. Tage eine Abnahme von 53,4%, am 57. eine von 39,6%. Die bisher gegebene Cholesterinmenge

beträgt 57 g pro Kilo Körpergewicht. Dann wird die Cholesteringabe unterbrochen und dafür 1,0 g Lecithin pro Kilo Körpergewicht gegeben. Dabei tritt die Erholung der abgeschwächten Glykolyse im Gegensatz zum Kaninchen Nr. 3 nicht so rasch auf, und erst nach einem Monate erholt sich die abgeschwächte Glykolyse, was vielleicht auf der grösseren Menge des vorher gegebenen Cholesterins beruht. Zu dieser Zeit ist der Cholesteringehalt trotz der erhaltenen Glykolyse im Blute noch etwa 9 fach grösser als der in der Kontrollzeit. Beim Fall 5 lässt sich bis zum 8. Tage nach der Cholesteringabe keine merkliche Abschwächung der glykolytischen Kraft erkennen, während sich der Cholesteringehalt etwa 4 fach im Vollblute, 4–5 fach im Blutplasma erhöht, aber in den Blutzellen nicht steigt. Am 19. Versuchstage zeigt sich, dass die Glykolyse an Kraft um 39,4% abgeschwächt worden ist, und der Cholesteringehalt steigt gleichzeitige etwa 10 fach im Vollblute und Blutplasma, etwas über 4 fach in den Zellen. Diese Abschwächung der Glykolyse wird dann allmählich wieder geringer, 33,5% am 34. Versuchstage, 26,5% am 41. Am 55. Tage zeigt die Glykolyse einen ganz normalen Wert, der andauert, bis das Kaninchen schliesslich am 75. Versuchstage tot gefunden wird. Für die Erklärung des Umstandes, dass die deutlich abgeschwächte Glykolyse spontan allmählich ihre frühere Kraft wieder bekam, die dann bis zum Ende dauerte, wurden nun zwei Proben angestellt, durch welche der Zucker extrahiert wurde: eine nach der bekannten Methode, eine zweite nach der Hämolyse durch wiederholtes Gefrierenlassen und Erwärmen unter Anwendung der Bangschen Lösung. Dadurch kann man entscheiden, ob der in die Blutzellen eingedrungene Zucker dort verbleibt, während es scheint, als ob er unter einer Spaltung verschwunden sei, weil die Blutkörperchen bei der Zuckerextraktion durch Zugiessen von Bangschem Reagens stark einschrumpfen und sich an das Fliesspapier dicht ansetzen, sodass der in die Blutkörperchen eingedrungene Zucker nicht vollständig aus den Zellen heraus in das Reagens hineinkommt. Doch kann man einen Unterschied zwischen den beiden Proben

erkennen, der Zucker ist nämlich in beiden auf gleiche Weise verschwunden, wie das Kaninchen Nr. 13 in der Tabelle I zeigt. Bei diesem Kaninchen ist es aber im Vergleich zu den andern Fällen ungewöhnlich, dass es bis zum Tode an Körpergewicht zugenommen hat, ohne Oedem an der Haut erkennen zu lassen. Danach sollte die Wiederbelebung der abgeschwächten Glykolyse bei diesem Versuchsfall vielleicht abhängig von irgend einem pathologischen Faktor sein, der aber hier nicht klargestellt werden kann. Pribram (1906), Becmeister und Bloor (1917) haben beim Kaninchen schon nachgewiesen, dass der Cholesteringehalt im Blute bei der Gabe des Cholesterins per os zunimmt. Nach Takahashi (1923) steigt der Cholesteringehalt 6,6 fach höher als der in der Norm, wenn dem Kaninchen 0,2 g Cholesterin pro die 72 Tage lang gegeben wird. Der Versuch von Ikeguchi und Kameda (1928) zeigt, dass der Cholesteringehalt bei täglicher Gabe von 0,5 g Cholesterin nach 30–40 Tagen sein Maximum, das 10–14 fache, erreicht. Bei einer weiteren Gabe zeigt er aber keine merkliche Veränderung mehr und beim Übergang zum gewöhnlichen Futter sinkt er schnell ab; 16 Tage später ist er 4–5 mal so hoch, und im weiteren Verlaufe wird er allmählich kleiner, ist jedoch nach 36 Tagen noch 3–4 mal grösser als normal. Wenn 1,0 g Cholesterin pro die gegeben wird, zeigt der Cholesteringehalt schon nach 20 Tagen einen 10 fach hohen Wert, und erreicht ein Maximum von einem 18–24 fach hohen.

Bei unseren Versuchen nimmt der Cholesteringehalt des Blutes schon innerhalb einer Woche nach der Cholesteringabe deutlich zu, und zwar im Blutplasma um das 4–5 bis 10 fache, in den Erythrocyten aber nur um das 1,5–5–6 fache. Dabei erleidet die glykolytische Kraft des Blutes eine Störung. Sie schwächt sich in 1–2 Wochen nach dem Hinzufügen des Cholesterins zum Futter um 23,3%–49,8% im Verhältnis zu der in der Norm ab. Im weiteren Verlauf zeigt sie eine Abnahme von 28,7%–53,4%, das letztere ist beim Fall 4 am 47. Tage zu beobachten. Eine Ausnahme bildet aber das Kaninchen Nr. 13, bei welchem eine Abnahme von 39,4% erst am

19. Tage nach der Cholesterinzugabe erscheint. Aus unseren obigen Versuchen kann man sehen, dass kein bestimmter Zusammenhang zwischen dem Abschwächungsgrade der Glykolyse und der Zunahme des Cholesteringehaltes im Blute besteht. Die abgeschwächte Hämoglykose erholt sich relativ schnell, wenn man die Cholesteringabe unterbricht und dem Tier dafür bald Lecithin gibt. Es scheint uns dabei wahrscheinlich, dass die Schnelligkeit der Erholung parallel zur Menge des vorher gegebenen Cholesterins erfolgt.

IV. KÖRPERGEWICHT UND BLUTZUCKERGEHALT DES KANINCHENS BEI CHOLESTERINFÜTTERUNG.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, lässt das Körpergewicht beim Fall Nr. 1 u. 2, bei welchen die Hämoglykolyse in kurzer Zeit nach der Cholesterinfütterung deutlich abnahm und sich auch nach der Aussetzung derselben nicht rasch erholte, die ganze Versuchszeit hindurch keine deutliche Veränderung erkennen. Beim Fall 1 nimmt das Körpergewicht nur 2,1% im Verhältnis zu dem vor dem Versuche ab, beim Fall 2 aber 4,4% zu. Beim Fall 3 nimmt es allmählich in einer Zeit von 27 Tagen 155 g (5,1%) im Maximum zu und während weiterer fünf Tage weiter 130 g,—im ganzen 285 g (9,4%),—wobei Lecithin anstatt Cholesterin gegeben wurde. Im weiteren Verlaufe vermindert das Körpergewicht sich etwas, zeigt aber noch eine Zunahme von 195 g (6,4%). Nun wird die Lecithingabe ausgesetzt, und bis zum 19. Tage danach bleibt das Körpergewicht fast konstant, nimmt dann aber allmählich ab, um endlich gegen den 35. Tag nach der Lecithinaussetzung auf das frühere normale Gewicht zu kommen. Beim Fall 4 vermehrt sich das Körpergewicht des Tieres um 465 g (13,8%) während der Versuchszeit mit der Cholesteringabe und in einer Woche, während der die Cholesteringabe unterbrochen und Lecithin gegeben wird, noch um 170 g (4,4%), im ganzen um 635 g (18,5%). Danach vermindert es sich aber allmählich und zeigt nach 44 Tagen eine Abnahme von 200 g im Vergleich mit dem in der Kontrollzeit. Wie schon erwähnt,

nimmt beim Fall 5, der durch die Cholesterinfütterung vorübergehend eine deutliche Abschwächung der Glykolyse und danach bis zum Tode eine fast normal starke Glykolyse zeigt, das Körpergewicht stetig und allmählich zu; und zwar konstatiert man eine Zunahme von 260 g (13,6%) am 68. Tage nach der Cholesteringabe und auch 5 Tage vor dem Tode noch eine solche von 200 g (8%). Bei diesem Fall wurde nicht genügend Blut entnommen, sodass man den Cholesteringehalt nicht immer bestimmen konnte. Obgleich man deshalb die Beziehung zwischen der erhaltenen Glykolyse und dem Cholesteringehalt nicht genau beobachten kann, so kann man doch aus den Resultaten anderer Fälle vermuten, dass die Erholung der einmal abgeschwächten Glykolyse bei diesem Fall nicht auf der Cholesterinmenge im Blute, sondern auf einem Faktor, unter dessen Einfluss das Körpergewicht bis zum Tode zugenommen hat, beruht. Darüber bedarf es aber noch weiterer Studien.

Der Blutzucker in der nüchternen Zeit vermindert sich in der Versuchszeit beim Fall 1 im allgemeinen. Beim Fall 2 zeigt er nur in der ersten Woche eine leichte Zunahme. Beim Fall 3 erhöht er sich am 5. Versuchstage leichtgradig und nach dem 10. im allgemeinen deutlich. Doch kommt er nach der Lecithingabe zum fast normalen Wert zurück und zeigt dazwischen nur einmal einen höheren Wert. Bei der Lecithinaussetzung und der Ernährung mit gewöhnlichem Futter erhöht der Blutzucker sich wieder etwas, geht aber in kurzer Zeit bis zum normalen Wert zurück. Beim Fall 4 zeigt er deutliche Zunahme in der ersten Woche, in der zweiten und dritten aber Abnahme bis zum normalen Wert der Kontrollzeit. Danach nimmt er bis zum 48. Versuchstage wieder allmählich zu. Bei der Lecithingabe statt Cholesterin kommt er wieder zu dem früheren normalen Wert zurück und verharret dabei eine lange Zeit. Beim Fall 5 nimmt er in der ersten Woche deutlich zu und behält auch in der dritten und vierten den fast gleichen Wert. Dieser sinkt allmählich, bleibt aber höher als der in der Kontrollzeit.

Zusammenfassend gesagt, lassen alle Fälle ausser dem Fall 1 eine mehr oder minder starke Zunahme des Körpergewichtes durch

die Cholesterinfütterung erkennen (mindestens 5%, höchstens 13%), was mit dem Resultate von Ikeguchi und Kameda (1928) übereinstimmt. Der Gehalt des nüchtern gemessenen Blutzuckers erhöht sich bei allen Fällen deutlich in der ersten Woche der Cholesteringabe mit Ausnahme von Fall 1, bei welchem er nach der Cholesteringabe abnimmt. Nach dem Versuche von Sakurai (1930), bei dem Kaninchen von 2000–2200 g Körpergewicht täglich 1 g Cholesterin per os eingegeben wurde, erscheint die Blutzuckerkurve höher, doch bleibt der Blutzuckergehalt in der nüchternen Zeit unverändert. Wenn wir bei unserem Versuche Lecithin statt Cholesterin geben, so kommen Körpergewicht und Blutzucker innerhalb eines Monates auf den normalen Wert zurück. Es ist aber nicht zu erkennen, ob diese Zunahme des Blutzuckers und Körpergewichtes durch die Cholesterinfütterung in einem bestimmten Zusammenhang zu dem früheren oder späteren Auftreten der abgeschwächten Glykolyse und zu dem Grade derselben steht.

V. KREUZVERSUCH DES CHOLESTERINBLUTES MIT NORMALEM BLUT.

Von dem mit Cholesterin gefütterten Kaninchen und dem gesunden wurde Blut entnommen und defibriert. Ein Teil jedes Blutes wurde auf die Zentrifuge gebracht und das Blutserum von den Blutkörperchen getrennt. Dann wurden die folgenden vier Proben der Reihe nach hergestellt, um an ihnen den hemmenden Einfluss des Cholesterins auf die Hämoglykolyse genauer zu beobachten:

1. Probe=defibriertes Cholesterinblut.
2. Probe=defibriertes Blut von gesundem Kaninchen.
3. Probe=Cholesterinserum+Blutkörperchen von gesundem Kaninchen.
4. Probe=Cholesterinblutkörperchen+Blutserum von gesundem Kaninchen.

Diese vier Proben wurden nun mit einer kleinen Menge 10%iger Traubenzuckerlösung versetzt und 24 Stunden lang im

Brutschrank bei 37°C gelassen, um auf die Glykolyse geprüft zu werden.

Nach Tabelle II zeigen die 1. und 4. Probe beim Fall Nr. 1 u. 2 abgeschwächte Glykolyse, während die Glykolyse bei der 3. Probe, der Aufschwemmung gesunder Blutkörperchen im Cholesterin-serum, sich nicht abgeschwächt zeigt, sondern noch etwas stärker als bei der Kontrollprobe (2. Probe) zur Erscheinung kommt. Bei anderen Fällen, Nr. 3, 4, u. 5, vermindert die obige 1. 3. u. 4. Probe ihre glykolytische Kraft fast in gleichem Masse. Daraus kann man ersehen, dass der hemmende Einfluss auf die Glykolyse bei den letzteren drei Fällen in Blutkörperchen und Blutserum, beim Fall Nr. 1 u. 2 aber nur in den Blutkörperchen vorhanden ist. Aus den beiden letzteren Fällen kann man vermuten, dass die Hemmung im Serum schon bei der Untersuchung verschwunden ist, während sie in den Blutkörperchen noch genügend in Aktivität bleibt. Das kann aber hier nicht sicher entschieden werden, da wiederholte Untersuchungen bei den anderen drei Fällen (3, 4, 5) in einer Zeit, wo der hemmende Einfluss im Serum verschwunden aber in den Blutkörperchen noch vorhanden ist, fehlen. Wir möchten aber annehmen, dass die hemmende Wirkung auf die Glykolyse noch eine Zeit lang nach der Cholesterinaussetzung andauert und dann zuerst aus dem Serum und später aus den Blutkörperchen verschwindet, wenn auch das Serum dabei noch eine grosse Menge Cholesterin enthält.

VI. VERSUCHE MIT LECITHINZUSATZ ZUM FUTTER.

Wie bei der Cholesterinfütterung wurde dem Kaninchen täglich 1,0 g Lecithin pro Kilo Körpergewicht als Beigabe zum Futter gegeben.

Auf der Tabelle III zeigt die Glykolyse am 14., 21., und 46. Tage nach der Lecithingabe an Stärke nur eine geringe Schwankung, wie sie auch bei normalen Kaninchen erkennbar ist, Demnach übt das Lecithin keinen merklichen Einfluss auf die Hämoglykolyse aus, trotzdem es 46 Tage lang gegeben wurde, und

TABELLE II.

Fall 1. (Kaninchen Nr. 1).

Nummer der Probe	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnahme			Erthro- zyten (Mill.)	Bemerkungen
	Vor dem Versuch	Nach 24 Std.	in mg	in	zu 1×10^6 Mill. Erythro- zyten		
1	449	261	188	41,8	30,4	6,176	Blut am 19. Tage nach der Cholesterin- aussetzung entnommen.
2	558	368	190	34,0	42,3	4,520	
3	467	215	252	53,9	56,9	4,425	
4	379	213	166	43,8	30,4	4,544	

Fall 2. (Kaninchen Nr. 2).

Nummer der Probe	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnahme			Erthro- zyten (Mill.)	Bemerkungen
	Vor dem Versuch	Nach 24 Std.	in mg	in	zu 1×10^6 Mill. Erythro- zyten		
1	510	378	132	25,9	24,1	5,472	Blut am 8. Tage nach der Cholesterin- aussetzung entnommen.
2	570	371	199	35,0	39,0	5,120	
3	494	243	251	50,6	48,1	5,210	
4	482	333	149	30,9	30,6	4,872	

Fall 3. (Kaninchen Nr. 3).

1	408	272	136	33,3	25,9	5,400	Cholesterin 26 Tage lang gegeben und kurz darauf Blut entnommen.
2	392	207	185	49,4	36,9	5,014	
3	398	239	159	40,0	27,6	5,760	
4	346	219	127	36,7	25,4	4,996	

Fall 4. (Kaninchen Nr. 7).

1	557	410	147	26,4	26,7	5,504	Blutentnahme am 57. Versuchstage; bis dahin 56 g Cholesterin pro kg Körpergewicht gegeben.
2	562	353	209	40,1	49,1	5,208	
3	374	257	117	31,2	27,9	4,192	
4	569	357	212	37,2	25,0	8,480	

Fall 5. (Kaninchen Nr. 13).

1	573	354	219	38,2	34,2	6,400	Blutentnahme in Laufe des Versuches (am 41. Tage); Gesamtmenge des bis dahin gegebenen Cholesterins 40 g pro kg Körpergewicht. Tier nach der Gabe von 74 g Cholesterin pro kg Körpergewicht gestorben.
2	714	526	188	26,4	41,5	4,560	
3	328	169	159	48,4	32,1	4,960	
4	531	363	168	31,6	34,1	4,928	

TABELLE III.

	Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg%	Zuckergehalt in mg%		Zuckerabnahme			Erythrozyten (Mill.)	Bemerkungen
				Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn.	mg	%	zu 1×10^6 Mill. Ery- throzyten		
Kontrolle	12. IX.	2,510	90	401	84	317	79,0	50,8	6,240	
	16. IX.	2,525	97	620	319	301	50,0	46,3	6,496	
Versuch	27. IX.	2,660	74	457	193	264	58,0	40,5	6,506	Seit 22. IX. 1g Lecithin pro kg Körpergewicht per os gegeben.
	5. X.	2,610	113	535	193	342	63,9	54,7	6,252	
	12. X.	2,600	93	359	76	283	78,8	44,2	6,400	
	21. X.	2,680		817	423	394	48,2	56,8	6,944	
	7. XI.	2,635	101	579	290	289	50,0	45,2	6,400	Die Gesamtmenge des Lecithins beträgt 46 g pro kg Körpergewicht.

dazwischen 3 Tage lang Lecithinaussetzung wegen der geringen Körperkräfte des Versuchstiers stattfand. Der Blutzuckergehalt zeigt den ganzen Verlauf hindurch fast keine merkliche Veränderung, nur einmal weist er einen höheren und niedrigeren Wert als den in der Kontrollzeit auf, was mit dem Versuchsergebnisse von Sakurai (1927) im grossen und ganzen übereinstimmt. Das Körpergewicht steigt im allgemeinen etwas an; am Ende des Versuchs zeigt es eine Zunahme von 110 g (4,3%).

VII. ÜBER DIE DAUER DER HÄMOGLYKOLYSE BEI DEN VERSUCHEN.

Wie schon im Abschnitt II erwähnt wurde, haben wir bei unseren Versuchen die glykolytische Kraft in 24 Stunden am Ende der Versuche verglichen. Es ist aber zur richtigen Beurteilung der Versuchsergebnisse wichtig zu erkennen, welchen Schwankungen die Hämoglykolyse im Verlauf von 24 Stunden unterworfen ist; ob das Cholesterinblut anfangs in kurzer Zeit eine stärkere Glykolyse und darauf eine schwächere oder von Anfang bis zum Versuchsende eine gleichgradig schwächere entfaltet, oder ob das Lecithinblut im Anfangsstadium des Versuches sich glykolytisch verschieden zum normalen Blut verhält. Um dies zu entscheiden, haben wir die Glykolyse in der 6., 12., 18. und 24. Stunde und noch weiter in der 48. und 72. untersucht.

Angenommen, dass die in 24 Stunden durch 1 Million Erythrozyten gespaltene Zuckermenge 100 Prozent ist, spaltet das normale Kaninchenblut in den ersten 6 Stunden eine Zuckermenge von 50%, in weiteren 6 Stunden 25% (im ganzen 75% in 12 Stunden) und in weiteren 12 Stunden den Rest, 25%. Dieser Verlauf der Glykolyse ist bei den zwei anderen Arten des Kaninchenblutes, dem Cholesterin- und Lecithinblute, nicht wesentlich verschieden. Danach können bei diesen Versuchen die Schwankungen der glykolytischen Kraft während der Versuchsdauer für die Beurteilung der Ergebnisse wohl ausser Acht gelassen werden. Es ist aber interessant, dass das Cholesterinblut selbst nach 48 und 72 Stunden

TABELLE IV

	Zuckergehalt in mg %						Zuckerabnahme in mg				Zuckerabnahme zu 1×10^6 Mill. Erythrozyten in mg				Erythrozyten (Mill.)				abgenommene Zuckermenge in jeder Versuchs- stunde $\times 100$				Bemerkungen	
																			dieselbe in 24 Stunden					
	Vor dem Versuch	Nach 6 Stdn.	Nach 12 Stdn.	Nach 18 Stdn.	Nach 24 Stdn.	6 Stdn.	12 Stdn.	18 Stdn.	24 Stdn.	6 Stdn.	12 Stdn.	18 Stdn.	24 Stdn.	6 Stdn.	12 Stdn.	18 Stdn.	24 Stdn.	6 Stdn.	12 Stdn.	18 Stdn.	24 Stdn.	am 54. Versuchs- tage entnommen		am 23. Versuchs- tage entnommen.
Blut von normalem Kaninchen	502	365	298	241	244	137	204	261	258	21,4	31,9	40,8	40,0	53,1	79,1	101	100	53,1	79,1	101	100			
Cholesterin- blut	533	421	364	302	292	112	169	231	241	21,2	32,0	43,8	45,6	46,5	70,2	96,0	100	46,5	70,2	96,0	100			
Lecithin- blut	579	441	390	328	290	138	189	251	289	21,6	29,5	39,2	45,2	47,8	65,3	86,7	100	47,8	65,3	86,7	100			
	Vor dem Versuch	Nach 6 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.	6 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.	6 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.	6 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.	6 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.			
Blut von normalem Kaninchen	390	276	126	105	118	114	264	285	272	18,6	41,6	44,9	42,9	44,7	100	107,9	103,1	44,7	100	107,9	103,1			
Cholesterin- blut	467	389	323	285	267	78	144	182	200	13,3	24,7	31,1	34,2	53,8	100	125,6	138,2	53,8	100	125,6	138,2			

noch eine geringe Glykolyse verrichtet, während das gesunde Kaninchenblut schon nach 24 Stunden fast keine merkliche Glykolyse mehr erkennen lässt. Doch ist die zersetzte Zuckermenge in 72 Stunden beim Cholesterinblut noch kleiner als die in 24 Stunden beim normalen Blute, wie die Tabelle IV angibt.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Hämoglykolyse des Versuchstiers nimmt meistens am 7.–14. Tage nach der Cholesterinfütterung um 23,3%–49,8% im Verhältnis zu der in der gesunden Kontrollzeit ab. Selten kommt diese Abnahme erst nach drei Wochen zur Erscheinung.

2. Der gesamte Cholesteringehalt im Blute nimmt schon innerhalb einer Woche deutlich zu, besonders stark im Blutplasma, weniger stark in den Blutzellen.

3. Es besteht kein Parallelismus zwischen der Cholesterinzunahme und der Abnahme der Hämoglykolyse.

4. Der hemmende Einfluss auf die Hämoglykolyse ist sowohl im Blutserum als auch im Blutkörperchen zu erkennen. Nach der Aussetzung der Cholesteringabe bleibt die verminderte Hämoglykolyse noch eine Weile lang fast stationär und kommt dann allmählich zum normalen Wert zurück, indem die Hemmung im Serum früher, in den Blutkörperchen später verschwindet.

5. Das Körpergewicht nimmt in der Versuchszeit in den meisten Fällen mehr oder weniger zu. Der nüchtern gemessene Blutzuckergehalt wird im allgemeinen grösser.

6. Wenn das Lecithin bald nach der Unterbrechung der Cholesterinfütterung gegeben wird, so erholen sich die abgeschwächte Glykolyse, der Blutzuckerspiegel und der allgemeine Körperzustand relativ rasch zur Norm.

7. Die Lecithinfütterung übt keinen merklichen Einfluss auf Hämoglykolyse, Blutzuckergehalt und Körpergewicht aus.

8. Der glykolytische Verlauf zeigt innerhalb 24 Stunden bei den drei Arten des Kaninchenblutes, dem normalen, Cholesterin- und Lecithinblute, eine fast gleiche Kurvenform.

Zum Schluss sprechen wir Herrn Prof. Dr. Y. Nukata, Direktor der Akademie, der uns gütige Unterstützung gewährte, Herrn Prof. Dr. Z. Hatta für seine freundlichen Ratschläge bei dieser Arbeit, und dem Ministerium des Unterrichtswesens, von dem wir einen Teil unserer Ausgaben aus dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Studien erhielten, unsern herzlichen Dank aus.

LITERATUR

- Asada, K. (1923, 1924): *Bioch. Zeitschr.*, **141**, 166, **142**, 165, **144**, 203.
Aibara, C. (1922): *Journ. of Biochem.*, **1**, 457.
Bloor u. Kundson (1917): *Journ. of Biol. Chem.*, **29**, 7.
Doyon et Morel (1903): *Comp. rend. soc. biolog.*, **55**, 215.
Funk u. v. Schönborn (1914): *Journ. of physiol.*, **48**, 328.
Hotta, K. (1924): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **136**, 1.
Ikeguchi, T. u. Kameda, T. (1928): *Osaka Igakkai Zassi*, **27**, 2399.
Ikeguchi, T. (1928): *Jikken Chiryō*, Nr. 88, 89 90 u. 91.
Kawashima, Y. (1922): *Journ. of Biochem.*, **2**, 131.
Kodama, E. (1925): *Journ. of Biochem.*, **5**, 185.
Lawaczek, H. (1923): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **125**, 229.
„ (1924): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **125**, 210.
Lépine u. Boulud (1907): *Maly's Jahresb.*, **36**, 157.
Macleod (1913): *Journ. of Biol. Chem.*, **15**, 497.
Milne u. Peter (1912): *Journ. med. research*, **26**, 415.
Pribram (1906): *Bioch. Zeitschr.*, **1**.
Rona u. Döhlín (1911): *Bioch. Zeitschr.*, **32**, 489.
Sakurai, T. (1926): *Nippon Naikagakkai Zassi*, **14**, 741.
Sakurai, T. (1937): *Nippon Naikagakkai Zassi*, **15**, 419.
„ (1930): *Nippon Naikagakkai Zassi*, **17**, 775.
Takemoto, H. (1927): *The Japan. Journ. of Exper. Med.*, **11**, Nr. 2.
Takahashi (1923): *Nippon Biseibutsugakkai Zassi*, **17**, Nr. 9.
Takayama, S. (1925): *Chugai-Iij-Shimpo*, Nr. 178.
Yada, K. (1921): *Igaku-Chuo-Zassi*, **19**, 822.

DER EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DIE SALZAUSSCHIEDUNG IN DER LEBERGALLE. (I)

VON

YUTAKA KAWADA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut, Okayama.

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1930)

Seit Shiff (1870) und Stadelmann (1896) ist allgemein bekannt, dass die Gallensäure einen enterohepatischen Kreislauf hat, indem sie durch die Galle in den Darm sezerniert, von der Darmschleimhaut wieder in der Leber abgefangen und dann aufs neue zur Gallenbildung verwendet wird.

Nach der Angabe von Okamura (1928) wird die Wirkung der Nucleinase in der Leber und dem Darm durch die Gallensäure stark gefördert, infolgedessen die Nucleinverdauung im Darm gefördert, und der Nucleinstoffwechsel in der Leber verstärkt. Schon Karasawa (1926/27) und Hatakeyama (1927) haben nachgewiesen, dass die Gallensäure die Nucleinspaltung im Organismus fördert, und dass infolgedessen die Zufuhr von Gallensäure eine Vermehrung der Phosphorsäure im Harn herbeiführt. Auf Grund der Daten hat Itoo (1930) sich dahin geäußert, dass sich die Phosphorsäure bzw. die primären und sekundären Phosphate infolge der fördernden Wirkung der Gallensäure auf den Nucleinstoffwechsel in der Galle vermehren, und dass dadurch die Wasserstoffionenkonzentration der Galle beeinflusst werden soll. Er hat auch gefunden, dass das pH der Lebergalle des Hundes durch Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird, und dass diese Steigerung von pH mit der Menge der Gallensäureausscheidung fast parallel geht.

Sekitoo (1929/30) hat bereits nachgewiesen, dass die Gallen-

säure den Calciumstoffwechsel beeinflusst, indem das Calcium im Blut durch deren überschüssige Zufuhr gesteigert wird, und die Calciumausscheidung im Harn bei Zufuhr von Gallensäure zunimmt.

Die Leber besitzt wie die Niere eine resorbierende, sekretorische und filtrierende Funktion. Somit muss die Calcium- und Phosphorsäureausscheidung in der Galle durch Zufuhr von Gallensäure gesteigert werden. Was die Salzausscheidung in der Lebergalle betrifft, so haben Usuki (1929) und Ohta (1927) beobachtet, dass die Calciumausscheidung in der Lebergalle des Kaninchens mit der Funktion des vegetativen Nervensystems und mit der der innersekretorischen Organe in innigem Zusammenhang steht. Nach ihnen soll die Calciumausscheidung der Lebergalle durch Exstirpation der Schilddrüse oder der Geschlechtsdrüse und auch durch parasymphatischen Reiz bedeutend gesteigert werden. Durch die Untersuchungen von Taku (1929), Sekitoo (1930) und Tsuji (1930) wurde klargestellt, dass die Wirkung der Gallensäure mit der Funktion des vegetativen Nervensystems in innigem Zusammenhang steht, die bekanntlich mit der Funktion der innersekretorischen Organe eng verknüpft ist.

Nach den Angaben von Inoue (1924), Kirita (1927) und Kurokawachi (1929) wird die Kolloidstabilität der Hydrosole sowohl durch die Salze bzw. des Calciums und Magnesiums als auch durch die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums stark beeinflusst. Dabei haben sie behauptet, dass der Einfluss der Salze und der Wasserstoffionenkonzentration auf die Kolloidstabilität der Gallensubstanz bei der Gallensteinbildung eine weitgehende Rolle spielt.

Im Sinne des Einflusses der Gallensäure auf die Wasserstoffionenkonzentration in der Galle und im Sinne des Einflusses der Salze bzw. der Erdalkalisalze auf die Kolloidstabilität der Gallensubstanz habe ich die Phosphorsäure und das Calcium der Lebergalle des Hundes bei Zufuhr von Gallensäure untersucht, die bekanntlich eine stark oberflächenaktive Substanz ist und nach dem

Choleinsäureprinzip von Wieland unter Bildung von Additionsverbindungen in Wasser unlösliche Substanzen zu lösen fähig ist.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Den Hunden wurde eine permanente Gallenblasen fistel nach Bickel (1929) angelegt, und die Blasenkanüle nach Ikoma (1927) eingenäht. Wenn sich die Tiere von dem operativen Eingriffe erholt halten, wurden sie zum Versuche verwendet. Eine Woche lang vor dem Versuche und während des Versuches habe ich den Hunden immer eine bestimmte Nahrung verabreicht, und zwar täglich 2 mal, mittags und um 6 Uhr abends, wie es in den Tabellen angegeben ist.

Während des Versuches stellte ich die Hunde in ein Gestell, bei dem eine Leinwand unter dem Bauche des Tieres so ausgespannt wurde, dass es sich darauf in ruhender Lage befinden konnte. Die Galle wurde 6 Stunden lang (von 6 Uhr morgens bis Mittag) in einer Glaskugel gesammelt.

Wie bereits bekannt ist, fördert die Gallensäure die Gallen- und Gallensäureausscheidung. Darum wurde bei dem einen Versuch den Hunden ein Maulkorb angelegt, um das Ablecken ihrer abfließenden eigenen Galle zu verhindern, während man bei dem anderen Versuch die Hunde ihre eigene Galle ruhig ablecken liess. Seit Petrof (1924) ist bekannt, dass sich beim Hunde die Gallenausscheidung durch Ableitung der Galle aus dem Organismus allmählich vermindert, bis sich schliesslich eine vollständige Acholie erzielen lässt. Aus diesem Grunde habe ich in dem einen Falle die Hunde am Ablecken ihrer eigenen Galle verhindert, im anderen Falle sie ruhig die Galle ablecken lassen und so den Einfluss der Zufuhr von Gallensäure auf die Salzausscheidung untersucht. Für den Versuch wurde den Hunden unmittelbar vor der Gallensammlung 0.05 g Natriumcholat pro kg Körpergewicht per os in 20 g Brot eingeschlossen zugeführt.

Zuerst wurden die Trockensubstanz und die Asche der Galle nach dem üblichen Verfahren bestimmt. Das Calcium in der

Galle wurde unter Veraschung auf dem trocknen Weg nach der Methode von Kramer-Tisdall (1921) bestimmt. Die Phosphorsäure wurde nach dem alkalimetrischen Verfahren von Neumann (1902/04) bestimmt. Bei der Bestimmung wurde dasselbe Verfahren von Kramer-Tisdall angewendet, um die Schwefelsäure aus der durch Säuregemisch veraschten Mischung zu entfernen. Zum Waschen des Niederschlages von Ammoniumphosphormolybdat wurde der Niederschlag in der grossen Zentrifuge aus Jena mit kaltem Wasser versetzt und stark zentrifugiert, und die obere Schicht des Zentrifugates mittelst Syphons abgelassen. Diese Behandlung wurde 3 mal ausgeführt. In demselben Zentrifugenglas wurde die Phosphorsäure titriert.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

1. Versuche ohne Ableitung der Galle nach aussen.

Bei diesen Versuchen habe ich die Hunde ihre eigene Galle ausserhalb der Sammelzeit ruhig ablecken lassen. Die Cholate wurden an die Hunde 3–7 Tage lang zu bestimmter Zeit verfüttert. Aus den Tabellen I–III sieht man, dass der Gehalt der Trockensubstanz und der Asche in der Galle durch die Zufuhr der Cholsäure sowohl der absoluten Menge nach, als auch prozentual gesteigert wird, und dass dieser gesteigerte Wert in allen Fällen nach 1–2 Tagen wieder auf den Anfangswert herabsinkt.

Was die Calciummenge betrifft, so wurde gefunden, dass der Calciumgehalt der Galle durch die Zufuhr der Cholsäure sowohl prozentual als auch absolut gesteigert, und zwar der absoluten Menge nach um 37–47%, prozentual um 9–14% vermehrt wird, wie es in den Tabellen I–III angegeben ist.

Der Phosphorsäuregehalt wird auch durch die Zufuhr der Cholsäure sowohl absolut wie auch prozentual gesteigert, und zwar beträgt diese Vermehrung der absoluten Menge nach 58–71%, prozentual 23–40%.

Also fördert die Zufuhr der Cholsäure die Ausscheidung des Calciums und der Phosphorsäure. Aus den Daten geht hervor,

TABELLE I.

Hund Nr. 1 Körpergewicht 20 kg.

(Futter: Reis 300 g, trockner Fisch 100 g, Gemüse 100 g, Sojasuppe 30 ccm, Wasser 1200 ccm)

Datum	Gallen- menge ccm	Reaktion	Spez. Gew.	Trockensubstanz		Asche		Calcium		Phosphorsäure		Bemer- kungen
				g	%	g	%	mg	mg%	mg	mg%	
29/Mar	76	Neutral	1018	3.405	4.48	0.714	0.94	9.58	12.6	65.28	85.9	
30/ "	75	"	1018	3.315	4.42	0.693	0.92	9.15	12.2	63.98	85.3	
31/ "	75	"	1018	3.345	4.46	0.698	0.93	9.38	12.5	56.65	78.2	
1/Apr.	75	"	1019	3.683	4.91	0.730	0.96	9.53	12.7	66.53	88.7	
2/ "	91	"	1019	4.932	5.42	0.928	1.02	12.83	14.1	92.27	101.4	Cholsäure ← 1.0 g (per os)
3/ "	90	"	1019	4.842	5.38	0.909	1.01	12.51	13.9	96.48	107.2	←
4/ "	86	"	1020	5.126	5.96	0.877	1.02	12.47	14.5	102.94	119.7	←
5/ "	95	"	1020	5.549	5.84	0.960	1.01	13.68	14.4	115.62	121.7	←
6/ "	90	"	1020	5.625	6.25	0.900	1.00	13.13	14.7	117.99	131.1	←
7/ "	90	"	1020	5.379	5.98	0.918	1.02	13.14	14.6	109.26	121.4	←
8/ "	91	"	1020	5.697	6.26	0.919	1.01	13.29	14.6	115.12	126.5	
9/ "	63	"	1019	3.263	5.18	0.599	0.95	7.88	12.5	65.58	104.1	
10/ "	65	"	1019	3.523	5.42	0.611	0.94	8.13	12.5	68.06	104.7	

TABELLE II.

Hund Nr. 2 Körpergewicht 15 kg

(Futter: Reis 250 g, trockner Fisch 100 g, Gemüse 100 g, Sojasuppe 30 ccm, Wasser 1000 ccm)

Datum	Gallen- menge ccm	Reaktion	Spez. Gew.	Trockensubstanz		Asche		Calcium		Phosphorsäure		Bemer- kungen
				g	%	g	%	mg	mg%	mg	mg%	
12/Apr.	87	Neutral	1016	2.984	3.43	0.887	0.02	9.83	11.3	44.20	50.8	
13/ "	88	"	1016	2.976	3.38	0.897	1.02	9.83	11.2	43.56	49.5	
14/ "	85	"	1016	3.094	3.64	0.867	1.02	9.78	11.5	48.52	57.2	
15/ "	96	"	1016	2.918	3.04	0.960	1.00	10.56	11.0	40.99	42.7	
16/ "	82	"	1017	3.050	3.72	0.896	1.06	9.68	11.8	48.71	59.4	Cholsäure ← 0.75 g (per os)
17/ "	108	"	1017	4.234	3.92	1.177	1.09	12.85	11.9	72.47	67.1	←
18/ "	124	"	1017	4.638	3.74	1.339	1.08	14.63	11.8	74.28	59.9	←
19/ "	108	"	1017	4.428	4.10	1.166	1.08	13.72	12.8	86.72	80.3	←
20/ "	110	"	1017	4.411	4.01	1.177	1.07	13.97	12.7	76.56	69.6	
21/ "	93	"	1016	3.097	3.33	0.967	1.04	10.42	11.2	47.71	51.3	
22/ "	70	"	1017	2.569	3.67	0.749	1.07	8.19	11.7	45.15	64.5	
23/ "	87	"	1016	2.706	3.11	0.922	1.06	9.66	11.1	37.76	43.4	
24/ "	69	"	1017	2.643	3.83	0.731	1.06	8.49	12.3	43.82	63.5	

TABELLE III.

Hund Nr. 3 Körpergewicht 18 kg

(Futter : Reis 150 g, trockner Fisch 70 g, Sajjasuppe 30 ccm, Wasser 800 ccm)

Datum	Gallen- menge ccm	Reaktion	Spez. Gew.	Trockensubstanz		Asche		Calcium		Phosphorsäure		Bemer- kungen
				g	%	g	%	mg	mg%	mg	mg %	
1/Mai	35	Alkal.	1019	1.923	5.50	0.406	1.16	4.80	13.7	33.60	96.0	
2/ "	40	"	1018	1.812	4.53	0.428	1.07	5.08	12.7	34.56	83.4	
3/ "	36	"	1021	2.326	6.46	0.410	1.14	5.40	15.0	44.42	123.4	
4/ "	45	"	1021	3.011	6.69	0.545	1.21	7.34	16.3	62.19	138.2	←
6/ "	50	"	1021	3.300	6.60	0.595	1.19	7.80	15.6	60.70	121.4	Cholsäure ← 0.9 g (per os)
7/ "	48	"	1021	3.053	6.36	0.562	1.17	7.30	15.2	56.56	117.9	←
8/ "	36	"	1018	1.735	4.82	0.392	1.09	4.64	12.9	32.00	88.9	
9/ "	30	"	1019	1.626	5.42	0.324	1.08	4.17	13.9	28.50	95.0	
10/ "	28	"	1020	1.700	6.07	0.316	1.12	4.03	14.4	30.16	107.7	
11/ "	39	"	1018	1.673	4.29	0.410	1.05	4.84	12.4	30.30	77.7	

dass der verminderte Gehalt der Galle an Gallensäure beim enterohepatischen Kreislauf zu einer herabgesetzten Ausscheidung des Calciums und der Phosphorsäure in der Lebergalle führt.

2. Versuch mit Ableitung der Galle nach aussen.

Bei diesem Versuch habe ich die Hunde ihre eigene Galle nicht ablecken lassen. Die Cholate wurden den Hunden 2–3 Tage zu bestimmter Zeit verabreicht. Wie die Tabellen IV–V zeigen, wird der Gehalt der Galle an Trockensubstanzen und Aschen sowohl absolut wie auch prozentual mit der Zeit allmählich vermindert, wenn man die Hunde am Ablecken der eigenen Galle verhindert. Dieser verminderte Gehalt an Trockensubstanz und an Asche wird durch die Zufuhr der Cholsäure wieder deutlich vermehrt gefunden. Was das Calcium betrifft, so wurde gefunden, dass der Calciumgehalt der Galle durch die Zufuhr der Cholsäure verglichen mit dem Anfangswert prozentual um 13–39%, der absoluten Menge nach um 35–87% steigt.

Die Vermehrung der Phosphorsäure bei Zufuhr von Cholsäure beträgt der absoluten Menge nach 46–94%, prozentual 11–61% des Anfangswertes. Diese Vermehrung der Phosphorsäure und des Calciums wird schon am nächsten Tage aufgehoben, und der Gehalt der Phosphorsäure und des Calciums wird wieder unter den Anfangswert herabgesetzt, wie es in Tabelle IV–V angegeben ist.

Es ist eine wohlbekannte Tatsache, dass die Zufuhr von Gallensäure die Ausscheidung der Galle fördert. Wie in den Tabellen I–III angegeben ist, wurde die Gallenmenge sowohl bei dem Versuch mit, als auch bei dem ohne Ableitung der Galle nach aussen durch die Zufuhr der Cholsäure gesteigert.

Aus den obigen Befunden sieht man, dass die Zufuhr der Cholsäure eine vermehrte Ausscheidung der Phosphorsäure und des Calciums in der Lebergalle herbeiführt, indem dabei gleichzeitig der Aschen- und Trockensubstanzgehalt gesteigert wird. Aus den Befunden geht ferner hervor, dass der vermehrte Gehalt an Trockensubstanz und an Asche der Lebergalle zum Teil durch die

TABELLE IV.

Hund Nr. 2 Körpergewicht 15 kg

(Futter: Reis 250 g, trockner Fisch 100 g, Gemüse 100 g, Sajjasuppe 30 cem, Wasser 1000 cem)

Datum	Gallen- menge cem	Reaktion	Spez. Gew.	Trockensubstanz		Asche		Calcium		Phosphorsäure		Bemer- kungen
				g	%	g	%	mg	mg%	mg	mg%	
19/Mai	90	Alkal.	1012	2.160	2.40	0.927	1.03	9.63	10.7	18.09	20.1	
20/ "	103	"	1012	1.978	1.92	1.051	1.02	10.20	9.9	11.95	11.6	
21/ "	100	"	1011	1.820	1.82	1.000	1.00	9.60	9.6	8.60	8.6	
22/ "	100	"	1011	1.780	1.78	0.970	0.97	9.30	9.3	7.90	7.9	
23/ "	120	"	1012	2.424	2.02	1.236	1.03	12.60	10.5	15.24	12.7	Cholsäure ← 0.75 g (per os)
24/ "	115	"	1011	1.886	1.64	1.116	0.97	10.70	9.3	8.17	7.1	
25/ "	105	"	1011	1.680	1.60	0.998	0.95	9.56	9.1	6.72	6.4	
26/ "	85	"	1010	1.318	1.55	0.808	0.95	7.06	8.3	2.72	3.2	

TABELLE V.

Hund Nr. 4 Körpergewicht 12 kg

(Futter: Reis 200 g, trockner Fisch 100 g, Gemüse 50 g, Sajasuppe 30 cem, Wasser 1000 cem)

Datum	Gallen- menge cem	Reaktion	Spez. Gew.	Trockensubstanz		Asche		Calcium		Phosphorsäure		Bemer- kungen
				g	%	g	%	mg	mg%	mg	mg%	
23/Juni	35	Neutral	1021	2.370	6.77	0.399	1.14	3.75	10.7	51.21	146.3	
24/ "	35	"	1019	1.943	5.55	0.385	1.10	2.49	7.1	39.94	114.1	
25/ "	36	"	1019	1.894	5.26	0.389	1.08	3.17	8.8	35.21	97.8	
26/ "	32	"	1019	1.734	2.42	0.346	1.08	2.78	8.7	32.67	102.1	←
27/ "	43	"	1019	2.430	5.65	0.477	1.11	5.20	12.1	48.63	113.1	Cholsäure ← 0.6 g (per os)
28/ "	44	"	1020	2.627	5.97	0.484	1.10	4.18	9.5	52.76	119.9	
29/ "	25	"	1019	1.320	5.28	0.245	0.98	1.68	6.7	24.78	99.1	
30/ "	24	"	1019	1.387	5.78	0.247	1.03	1.78	7.4	27.65	115.2	

Vermehrung der Phosphorsäure und des Calciums bedingt ist.

Natürlich beruht er auch auf der Vermehrung der Gallensäure in der Lebergalle, die seit Schiff und Stadelmann eine wohlbekannte Tatsache ist. Aus den Daten geht aber hervor, dass die Ausscheidung der Phosphorsäure und des Calciums von der Menge der Gallensäure in der Lebergalle stark abhängig ist, und dass die vermehrte Gallensäurebildung in der Leber oder die vermehrte Gallensäureausscheidung in der Lebergalle eine gesteigerte Ausscheidung des Calciums und der Phosphorsäure zur Folge hat.

Es ist wohlbekannt, dass primäres und sekundäres Phosphat in den Körperflüssigkeiten vorhanden ist, und dass das letztere vorherrscht. Andererseits haben Okamura (l. c.) Karasawa (l. c.) und Hatakeyama (l. c.) bewiesen, dass die Gallensäure die Nucleasewirkung der Leber und des Darmes und den Nucleinstoffwechsel des Organismus fördert. Nach den Daten scheint mir die vermehrte Ausscheidung der Phosphorsäure und des Calciums in der Galle bei Zufuhr von Gallensäure durch einen vermehrten Nucleinstoffwechsel in der Leber bedingt zu sein. Wenn das pH der Galle durch die Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird, wie es Itoo in seinem Versuch bewiesen hat, so scheint mir das vermehrte pH durch die Vermehrung des sekundären Phosphates bedingt zu sein. Darüber sind die Arbeiten jedoch noch nicht abgeschlossen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der Aschen- und Trockensubstanzgehalt der Lebergalle des Fistelhundes wird durch Zufuhr von Cholsäure sowohl ohne als auch mit Ableitung der Galle nach aussen gesteigert.

2. Sowohl ohne als auch mit Ableitung der Galle nach aussen wird die Ausscheidung der Phosphorsäure und des Calciums der Lebergalle des Hundes durch Zufuhr von Cholsäure sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual vermehrt.

Es scheint mir aus den Befunden hervorzugehen, dass die vermehrte Ausscheidung der Phosphorsäure auf der durch Zufuhr

von Cholsäure bedingten Steigerung des Nucleinstoffwechsels beruht, deren Folge eine Vermehrung des sekundären Phosphates in der Lebergalle ist, indem dadurch das pH der Galle bei Zufuhr von Cholsäure unter Verschiebung der Phosphatpufferung gesteigert wird.

LITERATUR.

- Hatakeyama, T. (1928): The Journ. of Bioch., **8**, 371.
Itou, T. (1930): Arbeiten Med. Univ. Okayama., **2**, 103.
Inoue, S. (1924): Rinsyo., **1**, 1169.
Karasawa, R. (1923): The Journ. of Bioch., **6**, 139.
" (1927): " **7**, 145.
Kramer, B. u. Tisdall, F. F. (1921): Journ. of biolog. Chem., **48**, 223.
Kirita, K. (1927): The Journ. of Gastroenterol., **2**, 1129.
Kurokawachi, M. (1929): " **4**, 336.
Neumann, A. (1902): Zeitschr. f. physiol. Chem., **37**, 115,
" (1904): " **43**, 32.
Ohta, R. (1927): The Journ. of Gastroenterol., **2**, 1273.
Okamura, Takeji (1928): The Journ. of Bioch., **8**, 391.
Petrof, E. (1921): Zeitsch. f. d. ges. exp. Med., **43**, 284. u. 291.
Schiff, M. (1870): Pflüger's Arch., **3**, 598.
Sekitoo, T. (1930): The Journ. of Bioch., **12**, 59.
Stadelmann, E. (1893): Zeitschr. f. Biol., **34**, 1.
Taku, A. (1928): The Journ. of Bioch., **9**, 299.
Tsuji, K. (1930): " **12**, 139.
Usuki, T. (1929): The Journ. of Gastroenterol., **4**, 1006.

ÜBER DIE DARSTELLUNG VON EIGELBLECITHIN.

VON

YUJI SUEYOSHI.

(Aus dem mediz.-chemischen Institut der Keio-Universität, Tokyo.

Vorstand: Prof. Teruuchi.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1930)

I. EINLEITUNG.

Zur chemischen und biochemischen Erforschung des Lecithins sind in sehr vielen Fällen Versuche mit reinem Material notwendig. Aber dieses reine Material war mit den jetzt gebräuchlichen Trennungsmethoden noch nicht zu gewinnen. Dadurch veranlasst, habe ich wiederholt verschiedene Versuche vorgenommen, aus deren Resultaten zu erkennen ist, dass die unten zu beschreibende Trennungsmethode die geeignetste ist.

II. BISHERIGE TRENNUNGSMETHODEN.

Von den bisher angewandten Trennungsmethoden sind als die bekannten zu nennen: a) die Erlandsensche, Methode (1907) b) die Macleansche Methode (1914) und c) die Levenesche Methode (1921), von denen a) und b) zusammenfassend betrachtet, jede als aus zwei Manipulationen bestehend anzusehen ist.

Erste Manipulation: Diese wird zur Entfernung der anderen Substanzen vorgenommen, als Phosphatiden, wie Fett und Cholesterin, und ihr Prinzip besteht in der Ausnutzung der Eigenschaft, dass Fett und Cholesterin in Aceton leicht löslich sind, während die Phosphatide darin unlöslich sind, d.h. das Ätherextrakt von Eigelb wird stark konzentriert und mit Aceton, solange Fällung eintritt, versetzt, wodurch das Lecithin und Kephalin zum Niederschlag gebracht werden.

Zweite Manipulation. Diese wird zur Beseitigung des

Kephalins nach folgendem Princip hervorführt: Das Prinzip ist, aus dem mit der ersten Manipulation gewonnenen Gemisch von Lecithin und Kephalin das letztere abscheiden zu lassen. Da das Lecithin in Alkohol leicht löslich, das Kephalin aber darin unlöslich ist, so ist ein Gemisch von beiden bei Alkoholzusatz aus einander zu trennen.

Es ist aber allbekannt, dass es durch die Darstellung nach der Erlandsenschen und der Macleanschen Methode noch nicht möglich ist, reines Lecithin zu gewinnen.

Die Levensche Methode besteht darin, aus einem Alkohol-extrakt von Gewebe mit einer alkoholischen Lösung von Cadmium Chlorid die Phosphatide zum Niederschlag zu bringen, dann aus den Cadmiumverbindungen der Phosphatide die Kephalinverbindung mit Äther zu entfernen und endlich aus der Lecithinverbindung mit ammoniakalischem Methylalkohol das Cadmium zu beseitigen. Auch das nach dieser Methode gewonnene Lecithin ist wegen des vermehrten Gehalts an Stickstoff offenbar für meinen Zweck nicht geeignet.

III. TRENNUNG DES LECITHINS.

Die vielen Versuche, die ich wiederholt vorgenommen, haben mich endlich dahin gebracht, die Trennungsmethode des Lecithins zu verbessern, wie unten ausgeführt werden soll.

A) Was das Verfahren zur Entfernung von Fett und Cholesterin aus den Phosphatiden betrifft, so bringt man nach den bisherigen Methoden, wie schon erwähnt, mit Aceton das Phosphatid zum Niederschlag und entfernt zugleich das in Aceton lösliche Fett und Cholesterin und zwar zu wiederholten Malen. Stern und Thierfelder⁽⁴⁾ konnten aber ungeachtet der Reinigung mit dieser über zehn-Mal wiederholten Manipulation nicht zum Ziel gelangen.

So ist die erste Manipulation nach den bisherigen Methoden, d. h. das Verfahren, das Lecithin mit Aceton zu reinigen, noch nicht genügend. Das so gewonnene Lecithin ist daher gelb bis

gelbbraun und halbflüssig, was darauf zurückzuführen ist, dass demselben verschiedene Substanzen, wie Fette, beigemischt sind. Aber wenn solche Beimischungen, wie unten erwähnt werden soll, nach meiner Methode vollständig entfernt werden, so kann ein Lecithin, das fast farblos und von viel festerer Konsistenz ist, gewonnen werden.

B) Da man, wie oben erwähnt, mit der Manipulation zur Reinigung des Lecithins mit Aceton, auch bei über zehnmaliger Wiederholung, doch das Fett noch nicht ganz entfernen kann, so muss zur weiteren Reinigung des Lecithins diese Manipulation noch weiter wiederholt werden. Ich habe sie folgendermassen ausgeführt:

Zuerst wird ein ätherisches Extrakt von Eigelb bei unter 40° im Vakuum abgedampft, zum Rückstand ungefähr das 3-4 fache Volumen Aceton zugesetzt, dann ein dadurch entstandenes Präcipitat aufgenommen, und wieder mit Zusatz des mehrfachen Volumen Aceton durchknetet, und endlich dieses dekantiert. Mit der häufigeren Wiederholung dieser Manipulation gewinnt das Lecithin allmählich festere Konsistenz, und seine rotgelbe Farbe wird mehr hellgelb. Wenn man die Manipulation mehr als 20 Mal wiederholt, so wird es so fest wie Wachs und fast farblos. Bei solchem Verfahren mit dem Lecithin muss das ungesättigte Fett und Cholesterin, welche in Aceton löslich sind, fast ganz entfernt werden. Aber es ist zu befürchten, dass ein winziger Teil von ungesättigtem Fett noch übrig bleiben kann; denn wie häufig man diese Manipulation auch wiederholen mag, es scheint schwer, durch das Kneten beigemischtes ungesättigtes Fett ganz zu entfernen. Allerdings wird dasselbe hier grösstenteils beseitigt, und wenn überhaupt, so bleibt nur ein wenig davon übrig, wenn dies auch sein sollte. Dieser winzige übrig bleibende Rest des Fetts kann mit dem unten zu erwähnenden Verfahren ganz entfernt werden.

C) Wie oben erwähnt, können nach dieser Methode, das Lecithin mit Aceton zu reinigen, bei genügender Wiederholung des Verfahrens in Aceton leicht lösliche Substanzen, wie ungesättigtes

Fett und Cholesterin, fast ganz entfernt werden; aber das gesättigte Fett, welches in kaltem Aceton wenig löslich ist, muss dabei in ziemlich grosser Menge übrig bleiben, wie die folgenden Untersuchungen zeigen. Da das gesättigte Fett schwer löslich in kaltem Aceton, aber leicht löslich in warmem Aceton ist, wird das nach der unter B) erwähnten Ausführung gereinigte Lecithin mit warmem Aceton extrahiert und abgekühlt. Dabei wird eine grosse Menge weisser Substanz ausgeschieden. Diese weisse Substanz ist zum grössten Teil kristallinisch und zum kleinen Teil amorph. Die amorphe Substanz ist leicht löslich, die kristallinische hingegen nur schwach löslich in kaltem Äther. Also lassen sich beide von einander trennen. Die amorphe Substanz stimmt in dem Gehalt an Phosphor und Stickstoff und in der Beschaffenheit derselben mit dem Phosphatid überein. Die kristallinische Substanz wird, da sie in warmem Äther leicht löslich, aber in kaltem Äther schwer löslich ist, viermal umkristallisiert, um ihre Beschaffenheit zu untersuchen. Die Resultate sind folgende:

1) Löslichkeit.

leicht löslich im warmen	schwer löslich im kalten
Alkohol	Alkohol
Äther	Äther
Aceton	Aceton

2) Schmelzpunkt, 59°. 3) Akrolein-Reaktion, deutlich.

4) P- und N-Reaktion, negativ.

5) Fettsäure: a) Menge (nach Kumagawa-Suto), 91,0%.

b) Jodzahl, 0. c) Schmelzpunkt, 56°.

6) Unverseifb. Subst., 0.

Die obigen Resultate zeigen, dass die Kristalle ein Gemisch der gesättigten Fette: Stearin und Palmitin sind.

D) Warum lösen sich gesättigte Fette, wie Stearin und Palmitin, in dem Ätherextrakt von Eigelb in grossen Mengen, während sie doch, wie oben erwähnt, in kaltem Äther schwer löslich sind?

Dies kann daraus erklärt werden, dass diese Substanzen in blossen Äther zwar schwer löslich sind, aber, wenn in dem Äther eine andere Substanz, wie ungesättigtes Fett, gelöst enthalten ist, durch diese gelöste Substanz in grosser Menge gelöst werden.

Denn, wenn man versuchsweise diese gesättigten Fette in Äther mit gelöstem Olivenöl bringt, so kann man erkennen, dass sie sich leicht lösen. Man dampfe durchsichtiges Ätherextrakt von Eigelb im Vakuum zu einer konzentrierten Lösung ab, setze dann Aceton dazu und bringe das Phosphatid zum Niederschlag, darauf löse man das Präcipitat wieder in dem Äther; dann wird eine unlösliche Substanz ausgeschieden, welche weissliche Trübung hervorbringt. Nun wird diese Substanz filtriert, und das durchsichtige Filtrat durch Abdampfung konzentriert. Es wird wieder trübe, wenn man wieder Äther hinzusetzt, eine Erscheinung, welche so hartnäckig vorkommt, dass Stern und Thierfelder (1907) auch mit ihrer über zehnmal wiederholten Manipulation diese weisse Substanz nicht beseitigen konnten.

Ich sammelte und analysierte diese weisse Substanz und fand, dass die Reaktion von Phosphor und Stickstoff anfangs positiv war, aber nach mehrmaliger Umkristallisierung mit warmem Äther negativ wurde; dass ferner ihr Schmelzpunkt und ihre anderen Eigenschaften denen des oben erwähnten Gemisches von Stearin und Palmitin entsprachen. Die Ursache, weshalb das gesättigte Fett, wie oben erwähnt, beim Zusatz von Äther zu dem mit Aceton gefällten Phosphatid sich ausscheidet, ist darin zu suchen, dass ein Teil des gesättigten Fettes, welcher bei Anwesenheit des ungesättigten Fettes gelöst war, durch die Entfernung eines Teiles des letzteren unlöslich ausgeschieden wurde.

E) Das mit Aceton gereinigte Lecithin enthält noch eine grosse Menge von gesättigtem Fett, welche daher entfernt werden muss. Da das gesättigte Fett sich in warmem Aceton in grosser, das Lecithin aber darin nur in kleiner Menge löst, kann man bei der Reinigung durch Berücksichtigung dieser Eigenschaften zum Ziel gelangen. Wenn das Lecithin in ein fast gleiches

Volum von Aceton, welches bis nahe an den Siedepunkt erwärmt ist, gebracht wird, so schmilzt es allmählich, bis es flüssig geworden ist; unter tüchtiger Umrührung wird dabei die in Aceton lösliche Substanz zur Auflösung gebracht, worauf die obere Flüssigkeit entfernt wird. Durch 6–7 malige Wiederholung dieser Manipulation kann die in warmem Aceton lösliche Substanz ganz entfernt werden. Die Reinigung des Lecithins mit diesem warmen Aceton hat die gleichzeitige Entfernung des noch etwa restierenden ungesättigten Fettes zur Folge. Dieses Verfahren, aus dem Phosphatid ungesättigtes und gesättigtes Fett zu entfernen, bringt selbstverständlich auch das Cholesterin zur Beseitigung, was auch daraus deutlich zu erkennen ist, dass in dem so gereinigten Lecithin keine unverseifbare Substanz enthalten ist.

F) Das mit dem oben erwähnten Verfahren gereinigte Phosphatid enthält kein Fett und Cholesterin mehr. Nun muss die zweite Manipulation, die anderen Phosphatide zu entfernen, vervollkommen werden. Die bisherigen Methoden bestehen darin, dass man, wie schon erwähnt, aus der ätherischen Lösung der Phosphatide mit Alkohol, in Alkohol unlösliche Phosphatide, wie das Kephalin, zum Niederschlag bringt, während das Lecithin in Lösung zurückbleibt. Aber in dem nach dieser Methode dargestellten Lecithin ist, wie allgemein anerkannt ist, noch eine grosse Menge Kephalin beigemischt vorhanden.

Dass in Alkohol unlösliche Substanzen wie Kephalin, sich in einer alkoholischen Lecithinlösung auflösen, muss wohl von dem Vorhandensein des Lecithins herkommen. Dieses Verhalten ist dasselbe, wie das, dass sich ein gesättigtes Fett bei Anwesenheit eines ungesättigten Fettes in Äther löst. Deswegen habe ich im folgenden Verfahren die beiden Phosphatide von einander trennen.

Bei der Abkühlung der alkoholischen Lecithinlösung, welche Kephalin enthielt, wurde ein weisser Niederschlag ausgeschieden, dessen Menge mit dem Abfall der Temperatur immer grösser wurde. Nachdem die Lösung bis -13° abgekühlt worden, wurde die obere Flüssigkeit untersucht, was ergab, dass darin kein Aminostick-

stoff enthalten war. Also müssen durch diese Abkühlung in Alkohol unlösliche Substanzen, wie das Kephalin, ganz ausgeschieden worden sein, aber es war unvermeidlich, zugleich auch einen Teil des Lecithins auszuschcheiden.

IV. ANALYSENRESULTATE.

Die Untersuchung des nach der oben erwähnten Methode gewonnenen Lecithins hat folgende Resultate ergeben:

Eigenschaften: Das Lecithin war von wachsartiger Konsistenz und fast farblos, in Alkohol und Äther löslich, in sehr kaltem Äther weniger löslich, und veränderte beim Aufbewahren in Aceton die Farbe am langsamsten.

Analysenresultate:

- | | |
|---|--------|
| 1) Phosphor (n. gravimetrischer Bestimm.), | 3,84% |
| 2) Stickstoff (n. Kjeldahl), | 1,74% |
| 3) Fettsäure (n. Kumagawa-Suto, Alkoholische Lecithinlösung wurde mit 2%NaOH + 2%Ba(OH) ₂ -Lösung bei Zimmertemperatur verseift.), | 70,09% |
| 4) Unverseifb. Subst. (n. Kumagawa-Suto.), | 0. |

V. UNTERSUCHUNG ÜBER LECITHINCADMIUM.

Wenn zu der alkoholischen Lösung des nach dem obigen Verfahren darfiestellten Lecithins eine alkoholische Lösung von CdCl₂ zugesetzt wird, entsteht ein weisser Niederschlag, eine Lecithincadmium-Verbindung. Diese Verbindung, in warmem Alkohol gelöst und allmählich abgekühlt, zeigt schöne Kristalle, wie die Figur zeigt. Diese Kristalle bräunten sich bei 140°.

Da diese Kristalle sämtlich fadenförmig sind, ist zu erkennen, dass die Kristalle nur aus Lecithincadmium bestehen.

VI. VERGLEICHUNG DES LECITHINS MIT DEM LECITHINCADMIUM.

In folgenden sind die Resultate, welche die Analyse der Lecithincadmium-Kristalle einerseits und des nach obigem Verfahren

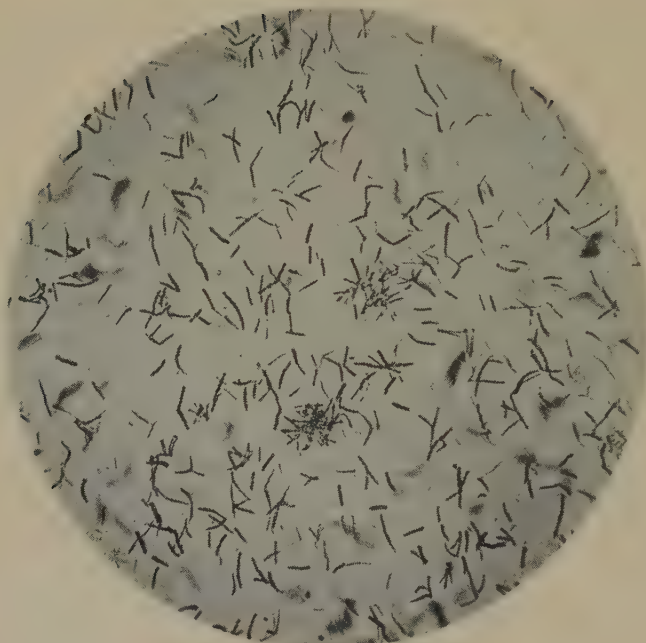


Fig. 1.

dargestellten Lecithins andererseits ergab, vergleichend zusammengestellt. Wenn die Resultate der letzteren mit denen der ersteren in gleichem Verhältnis stehen, so muss auch das Lecithin rein sein.

Analysenmethode. Bei den Lecithincadmium-Kristallen wurden der Gehalt von P, N und Fettsäure nach der schon erwähnten Methode, an Cadmium nach der Cadmiumoxyd-Methode bestimmt. Die Resultate sind im folgenden zusammengestellt.

1) Phosphor (n. gravimetrischer Bestimm.),	3,00%
2) Stickstoff (n. Kjeldahl),	1,42%
3) Fettsäure (n. Kumagawa-Suto.),	57,04%
4) Cadmium (n. h. Cadmiumoxyd-Methode),	11,13%

Die Vergleichung der mit Lecithincadmium und mit Lecithin erhaltenen Resultate ergibt folgendes.

	Lecithin-Cd. %	Lecithin %	Verhältnis.	
			Lecith.-Cd.	Lecith.
P.	3,00	3,84	1,00	1,27
N.	1,42	1,74	1,00	1,23
Fettsäure	57,04	70,09	1,00	1,23

Mit den beiden Präparaten ergeben sich immer fast übereinstimmende Resultate, also muss das Lecithin rein sein.

VII. DARSTELLUNGSMETHODE DES LECITHINS.

Aus dem oben Erwähnten stellt sich heraus, dass das von mir dargestellte Lecithin sehr rein ist. Ich gebe im folgenden nochmals die Darstellungsmethode an.

Zuerst wurde das Eigelb mit dem mehrfachen Volum Äther extrahiert, das Filtrat im Vakuum bei unter 40° abgedampft, eine hierdurch entstandene obere ölige Substanz entfernt, und die untere gelbe Masse mit Zusatz des ungefähr gleichen Volumen Aceton umgerührt, was nach der Dekantierung der oberen Flüssigkeit wiederholt wurde. Mit der häufigen Wiederholung des Verfahrens wird die Masse, welche anfangs gelb und weich war, allmählich mehr hellgelb und von festerer Konsistenz, bis sie sich nicht mehr umrühren lässt. Dann wird alles in den Mörser gebracht und nach Zusatz von Aceton durchgeknetet, die obere Flüssigkeit ausgegossen und wieder mit Aceton durchgeknetet. Mit der Wiederholung dieser Manipulation wird die Masse von leimartiger Konsistenz, nach und nach so fest wie Wachs und fast farblos. Dann wurde dazu das 5-6 fache Volumen absoluten Alkohols zugesetzt. Das Filtrat wird mit einer Kältemischung bei unter -13° abgekühlt, worauf die in absolutem Alkohol unlöslichen Bestandteile gefällt und davon die überstehende Flüssigkeit getrennt wurden. Eine andere Weise der Ausführung ist, das Filtrat mit einer Kältemischung bei unter -18° abzukühlen und dann möglichst schnell zu filtrieren. Die obere Flüssigkeit oder das Filtrat wird bei unter 50° in Vakuum abgedampft, und nach Acetonzusatz ein Niederschlag gefällt. Wenn man den Nieder-

schlag, das Lecithin, in erwärmtes Aceton (bei 55°) hineingibt, entsteht eine flüssige Masse, aus der nach vollständigem Mischen die obere Flüssigkeit entfernt, und die so gewonnene Masse nochmals zu dem erwärmten Aceton zugesetzt wird. Das Verfahren wird 7–8 mal wiederholt. Das dadurch gewonnene Lecithin ist fast farblos und zeigt eine wachsartige Konsistenz.

Zu den Kosten dieser Arbeit ist vom Verein zur Erinnerung an das 300 jährige Jubiläum des Toshogu beigesteuert worden.

LITERATUR.

Erlandsen (1907): Zeitsch. physiol. Chem., **51**, 71.

Levene and Rolf (1921): J. Biol. Chem., **46**, 193.

MacLean (1914): Lecithin and allied substances. II. Edition, 84.

Stern u. Thierfelder (1907): Zeitsch. physiol. Chem., **53**, 370.

ÜBER DIE FETTSÄUREN DES EIGELBLECITHINS.

I. Mitteilung. Die gesättigten Fettsäuren.

VON

YUJI SUEYOSHI UND TOMIJI FURUKUBO.

(Aus dem mediz.-chemischen Institut der Keio-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Teruuchi.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1930)

EINLEITUNG.

Über die Fettsäuren des Lecithins haben seit langer Zeit viele Autoren Studien gemacht, aber ohne grosse Rücksicht darauf zu nehmen, dass das dazu zu verwendende Material von Fett und Kephalin frei sein muss. Neuerdings haben Levene und Rolf (1921) in Rücksicht hierauf Untersuchungen angestellt, welche aber auf die Arten der Fettsäuren beschränkt, dagegen auf das quantitative Verhältnis der einzelnen Fettsäuren nicht ausgedehnt waren.

Zur Klarstellung dieses Verhältnisses habe ich daher die folgenden Versuche vorgenommen, in dem ich nach der Sueyoshischen Methode (1931) rein dargestelltes Lecithin als Material verwendete. Durch diese Versuche konnte ich ausser der Feststellung des quantitativen Verhältnisses der Fettsäuren noch weitere Fettsäuren finden, welche die bisherige Erforschung des Lecithins noch nicht entdeckt hatte.

Die gesättigten Fettsäuren des Eigelb-Lecithins sollen nach Levene und Rolf Stearin- und Palmitinsäure sein. Aber meine Versuche haben festgestellt, dass diese Fettsäuren nur wenig im Lecithin vorhanden sind. Im folgenden sollen die Versuche beschrieben werden.

Trennung der Fettsäuren.

Das Lecithin wurde in Alkohol aufgelöst, 5% Natrium Alkoholat hinzu gesetzt, und das Ganze bei Zimmertemperatur ca. 10 Stunden lang stehen gelassen; dann wurde mit Salzsäure angesäuert, und sodann wurde nach Zusatz von Äther im Vakuum bei 40° der Alkohol abgedampft. Der Rückstand wurde mit Äther extrahiert, das Extrakt mit Wasser gewaschen, und der Äther im Vakuum abgedampft. Die so erhaltenen Fettsäuren wurden in gesättigte und ungesättigte getrennt. Die gesättigten Fettsäuren wurden aus den Bleisalzen von Lecithinfettsäure mit Äther auf gewöhnliche Weise von den ungesättigten getrennt und die weitere Untersuchung über die gesättigten Fettsäuren ausgeführt.

I. TRENNUNG DURCH FRAKTIONIERTE FÄLLUNG.

A) 3,2 g gesättigter Fettsäuren wurden in 200 cem 95 proz. Alkohol gelöst; wenn zu 20 cem der Lösung 17 cem gesättigter alkoholischer Bleiazetatlösung zugesetzt wurden, konnte die Gesamtmenge der Fettsäure als fettsaures Blei zum Niederschlag gebracht werden. Nachdem wir das mit Experimenten festgestellt hatten, schieden wir durch Zusatz von 30.6 cem Bleiazetatlösung zu 180 cem der Fettsäurelösung das Bleisalz vollständig aus und filtrierten dann: dem Filtrat wurden wieder 30.6 cem Bleiazetatlösung hinzugefügt und das fettsaure Blei gefällt. Durch Wiederholung dieses Verfahrens wurden 5 fraktionierte Fällungsmassen erhalten.

Die Fällungsmassen wurden mit Alkohol gewaschen, nach Zusatz von Äther und Salzsäure geschüttelt, die Ätherlösung abgedampft, und endlich der Schmelzpunkt des Rückstandes bestimmt. Die Resultate zeigt die folgende Tabelle.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich, ist fast kein Unterschied zwischen dem Schmelzpunkt der ersten und dem der fünften Fraktion zu erkennen: der Schmelzpunkt hält sich in den engen Grenzen von 55,5° und 56,5°.

B) Die Resultate der Versuche zeigten, dass die Fettsäuren,

TABELLE I.

Fraktion	Schmelzpunkt
I	56,-56,5°
II	55,-56.°
III	55,5.°
IV	55,5.°
V	55,5.°

aus den Fraktionen I und V abgeschieden, von derselben Art waren. Zur genaueren Untersuchung habe ich noch folgende Versuche vorgenommen:

Mit den durch dieselbe Behandlung wie in den vorigen Versuchen gesammelten Fraktionsmassen wurden nochmalige Fraktionen ausgeführt, welche die aus der Tabelle II (A, B, C) ersichtlichen Resultate ergeben haben.

Zuerst seien die Resultate bei derselben Behandlung wie in den vorigen Versuchen erwähnt.

TABELLE II A,

Versuch 1		Versuch 2	
(Schmelzpunkt der Fettsäure 55,5°)		(Schmelzpunkt der Fettsäure 55,5°)	
Fraktion	Schmelzpunkt	Fraktion	Schmelzpunkt
I	56,5°	I	56,5°
II	56,5°	II	56,5°
III	55,5°	III	55,5°
IV	55,5°	IV	55,5°
V	55,5°	V	55,5°

Die Fraktionssubstanzen aus den Versuchen 1. und 2, I und II einerseits, IV und V andererseits wurden nochmals gesammelt, und

mit jeder Sammlung die fraktionierte Fällung wiederholt, was die folgenden Resultate ergab:

TABELLE II B.

Fraktion	Schmelzpunkt
I	56,5–57°
II	56°
III	56°
IV	55,5–56°
V	55,5°

TABELLE II C.

Fraktion	Schmelzpunkt
I	55,5°
II	55,5°
III	56°
VI	57°
V	56°

Die Versuche unter C) wie auch unter B) ergaben dieselben Resultate wie die Versuche unter A), d.h. dass die Fettsäure aus allen Fraktionen einen Schmelzpunkt von 55,5–56,5° hatte.

Deshalb habe ich weiter mit einer Fettsäure, welche mit Stearin- und Palmitinsäure so weit gemischt war, dass der Schmelzpunkt 55,5–56,5° war, Versuche vorgenommen und die Resultate mit einander verglichen. Denn nach der bisherigen Literatur sollen, wie schon erwähnt, die gesättigten Fettsäuren des Lecithins ein Gemenge von Stearin- und Palmitinsäure sein.

Versuch 1. Die Fettsäure wurde mit Stearin- und Palmitinsäure zu gleichen Teilen gemischt. Das Ergebnis ist aus der Tabelle III ersichtlich.

TABELLE III.

Gemischte Fettsäure (Schmelzpunkt 56,5°)		Lecithinfettsäure (Schmelzpunkt 56°.)	
Fraktion	Schmelzpunkt	Fraktion	Schmelzpunkt
I	63,5-64°	I	55,5-56°
II	61. -63.°	II	55,5°
III	56, -58.°	III	55,5-56°
IV	55,5-56°	IV	55,5-56°
V	54, -55°	V	56, -56,5°

Versuch 2. Dann wurden mit Fettsäure, die mit Stearinsäure im Verhältnis von 35% und mit Palmitinsäure im Verhältnis von 65% gemischt war, dieselben Versuche wie oben vorgenommen, deren Resultate die Tabelle IV zeigt.

TABELLE IV.

Gemischte Fettsäure (Schmelzpunkt 55,5-56°)		Lecithinfettsäure (Schmelzpunkt 56°.)	
Fraktion	Schmelzpunkt	Fraktion	Schmelzpunkt
I	64,-65,5°	I	55,5-56°
II	59,-60°	II	55,5-56°
III	56,-56,5°	III	55,5-56°
IV	55,°	IV	55,5-56°
V	55,-55,5°	V	56, -56,5°

Versuch 3. Darauf wurde mit einer Fettsäure, welche mit Stearin- und Palmitinsäure im Verhältnis der Molekulargewichte gemischt war, auf gleiche Weise verfahren. Die Resultate sind aus der Tabelle V zu ersehen.

D) Die Zusammenfassung der obigen Versuchsergebnisse zeigt, dass wenn die Fraktion mit einem Gemenge von Stearin- und Palmitinsäure ausgeführt wird, die Fettsäure bei der Frak-

TABELLE V.

Gemischte Fettsäure (Schmelzpunkt 56,5°)		Lecithinfettsäure (Schmelzpunkt 56°)	
Fraktion	Schmelzpunkt	Fraktion	Schmelzpunkt
I	64,5–65,5°	I	56°
II	58, –59°	II	56°
III	56, –56,5°	III	56°
IV	54,5–55°	IV	56,5°
V	55,5–56,5°	V	55,5°

tion I immer einen Schmelzpunkt von 63,5–65,5°, die bei der Fraktion II aber einen solchen von 58,–63°, hatte. Also ist zu erkennen, dass die Fettsäure bei der Fraktion I hauptsächlich aus Stearinsäure bestand, mit welcher etwas Palmitinsäure gemischt war, während in der bei der Fraktion II. eine ziemlich grosse Menge von Stearinsäure enthalten war. Aber die Versuche mit Lecithinfettsäure zeigten, dass die Fettsäure bei der Fraktion I keinen von der ursprünglichen verschiedenen Schmelzpunkt hat. Also ist die Lecithinfettsäure nicht als ein Gemenge von Stearin- und Palmitinsäure anzusehen. Gesetzt, dass diese Fettsäuren vorhanden wären, so ist ihre Menge doch als winzig anzunehmen: die gesättigte Fettsäure des Lecithins besteht vielmehr hauptsächlich aus Fettsäuren, welche bei 55,5–56,5° schmelzen.

II. TRENNUNG DER FETTSÄUREN NACH DER KREIS UND HAFNERSCHEN METHODE.

In 100 ccm 94.5 Vol.% Alkohols löst sich nach Kreis und Hafner bei 0° von Stearinsäure 0.12g und von Palmitinsäure 0.52 g. Um also nicht die letztere, sondern die erstere zu fällen, wurde zu der zu untersuchenden Fettsäuren die entsprechende Menge von Alkohol zugesetzt, und der Schmelzpunkt des Niederschlags bestimmt.

Darauf wurde zu dem Filtrat zur Trennung von etwa noch

gelöst vorhandener Stearinsäure eine entsprechende Menge alkoholischer Lösung von Mg-Acetat zugegossen, filtriert, und der Schmelzpunkt der Fettsäure im Filtrat (Filtrat I) bestimmt. Wenn die Menge des verwendeten Mg-Acetats nicht genügte, wurde noch $\frac{1}{3}$ zugesetzt, und der Schmelzpunkt der Fettsäure im Filtrat (Filtrat II) nochmals bestimmt.

Ich nahm die obigen Versuche mit Lecithinsäure vor und verwendete zugleich eine Mischung von Stearin- und Palmitinsäure als Material, um vergleichende Untersuchungen anzustellen. Die benutzten Mengen und die Resultate sind aus der folgenden Beschreibung zu ersehen:

Versuch 1. 1 g Fettsäure wurde in 140 ccm conc. 94.4 Vol.% Alkohol gelöst und so behandelt, wie oben erwähnt, wobei 11 ccm 1.5%iges Mg-Acetat zur Verwendung kamen. Die Resultate sind folgende (Tab. VI.):

TABELLE VI.

Gemischte Fettsäure		Lecithinfettsäure	
Schmelzpunkt der ausgeschied. Kristalle.	Schmelzpunkt der Fettsäure im Filtrat.	Schmelzpunkt der ausgeschied. Kristalle.	Schmelzpunkt der Fettsäure im Filtrat.
63°	56°	57°	55,5°.

Versuch 2. 1.5g Fettsäure wurde in 300 ccm Alkohol gelöst, 18 ccm 1% Acetats gebraucht. Die Resultate zeigt die Tab. VII.

TABELLE VII.

Gemischte Fettsäure		Lecithinfettsäure	
Schmelzpunkt der ausgeschied. Kristalle.	Schmelzpunkt der Fettsäure im Filtrat.	Schmelzpunkt der ausgeschied. Kristalle.	Schmelzpunkt der Fettsäure im Filtrat.
65,-65,5°	55,5-56°.	keine Ausscheid.	55,-55,5°.

Versuch 3. 1g Fettsäure in 100 cem Alkohol gelöst. Die hier verwendete Menge 1,5% Mg-Acetats betrug 9 cem, beim zweiten Mal 6 cem. Die Resultate werden in der folgenden Tabelle VIII angegeben.

TABELLE VIII.

Gemischte Fettsäure			Lecithinfettsäure		
Schmelzpunkt der ausgeschied, Kristalle.	Schmelzpunkt der Fettsäure, im Filtrat I	im Filtrat II	Schmelzpunkt der ausgeschied, Kristalle.	Schmelzpunkt der Fettsäure, im Filtrat I	im Filtrat II
65°	56°	59,-60°	57°	55°	57-57,5°

Aus den obigen Resultaten ergibt sich, dass die aus der gemischten Fettsäure ausgeschiedene Fettsäure einen Schmelzpunkt von 63.0-65.5° hat, während die aus der Lecithinfettsäure ausgeschiedene bei 56,5° schmilzt. So lässt sich erkennen, dass erstere hauptsächlich aus Stearinsäure besteht, letztere von ganz gleicher Art mit der ursprünglichen ist, und daher auch beim Versuch II keine Ausscheidung der Fettsäure d. h. der Stearinsäure vorkommt.

Es ist also unmöglich zu folgern, dass Stearinsäure in der Lecithinsäure vorhanden ist: selbst angenommen, dies wäre möglich, so wäre doch ihre Menge nur verschwindend gering. Auch kann man erkennen, dass fast die gesamte Lecithinfettsäure einen Schmelzpunkt von ca. 56° hat.

Die Fettsäure, welche im Filtrat I vorkommt, zeigt sowohl bei der gemischten Fettsäure, als auch bei der Lecithinsäure einen Schmelzpunkt von 55-56°, aber diejenige, welche sich im Filtrat II findet, bei der gemischten Fettsäure einen auf 59-60° gestiegenen, ein Schmelzpunkt, welcher zeigt, dass er sich dem der Palmitinsäure angenähert hat, während der Schmelzpunkt bei der Lecithinfettsäure noch immer bei 57-57,5° bleibt. Daraus kann man annehmen, dass, wenn in der Lecithinfettsäure eine Palmitin-

säure enthalten ist, so nur in geringer Menge. Der Schmelzpunkt der im Filtrat II enthaltenen Fettsäure zeigt eine geringe Erhöhung; daraus zeigt sich ebenfalls, dass Palmitinsäure in der Lecithinfettsäure in sehr geringen Mengen vorhanden ist.

III. UNTERSUCHUNG NACH DER HEHNER UND MITCHELLSCHEN METHODE.

A.) Aus den obigen Versuchsergebnissen lässt sich das Vorhandensein von Stearinsäure in der Lecithinfettsäure nicht nachweisen. Um das noch weiter zu beweisen, habe ich nach der Hehner- und Mitchellschen Methode untersucht.

Ich stellte bei 0° 92%ige methylalkoholische gesättigte Lösung von Stearinsäure dar, löste darin eine gewisse Menge der zu untersuchenden Fettsäure, liess die Lösung eine Nacht hindurch in Eiswasser stehen und bestimmte die Menge der ausgeschiedenen Krystalle.

Ich habe ausser mit Lecithinfettsäure noch mit einem Gemenge von Stearin- und Palmitinsäure und mit jeder der beiden letzteren die gleichen Versuche ausgeführt und die Resultate mit einander verglichen.

Versuch I. Derselbe wurde gemacht, nachdem in 100 ccm mit Stearinsäure gesättigten Methylalkohols die verschiedenen Fettsäuren im Verhältnisse, welches die Tab. IX zeigt, gelöst worden waren.

TABELLE IX A.

Fettsäure	Lecithinfettsäure	Gemischte Fettsäure	Stearinsäure	Palmitinsäure	Kontrolle. gesättigte Stearinsäurelösung
angewandte Menge	0,4 g	0,4 g	0,2 g	0,2 g	
Ausscheidungsgrad	—	++++	++++	—	—
Ausgeschiedene Menge	0	ca, 0,2 g	ca, 0,2 g	0	0

Versuch II. Nur die Fettsäure in geringerer Menge verwendet, im übrigen auf dieselbe Weise verfahren, wie im Versuch I. Die Resultate sind die folgenden:

TABELLE IX B.

Fettsäure	Lecithin- fettsäure	Gemischte Fettsäure	Stearin- säure	Palmitin- säure	Kontrolle. gesättigte Stearin- lösung
angewandte Menge	0,3 g	0,3 g	0,15 g	0,15 g	—
Ausscheidungsgrad	—	++++	+++	—	—

Die obigen Versuchsergebnisse zeigen, dass bei den Versuchen mit der gemischten Fettsäure oder der Stearinsäure eine grosse Menge Stearinsäure, aber bei denen mit Lecithin- und Palmitinsäure nichts davon ausgeschieden wird. Daraus ist zu erkennen, dass in Lecithinfettsäure keine oder doch nur wenige Stearinsäure vorhanden ist.

B) Von dem Prinzip der Hehner und Mitchellschen Methode zur Ausscheidung der Stearinsäure ausgehend, habe ich folgende Versuche mit Palmitinsäure vorgenommen:

Zuerst wurde bei 0° methylalkoholische gesättigte Lösung von Palmitinsäure hergestellt, in welcher eine gewisse Menge der Fettsäure, die untersucht werden soll, gelöst wurde, worauf die Lösung die ganze Nacht hindurch abgekühlt und die Menge der ausgeschiedenen Fettsäure untersucht wurde. Diese Versuche wurden, wie die vorigen, mit der Lecithinfettsäure, der gemischten Fettsäure und sowohl mit Stearin- wie Palmitinsäure ausgeführt.

Versuch I. In 100 ccm mit Palmitinsäure gesättigten Methylalkohols wurden die Fettsäuren im Verhältnis, das Tab. X. A. zeigt, gelöst und bei 0° die ganze Nacht hindurch abgekühlt.

Versuch II. Hier wurde so verfahren, wie im Versuch I, und bei 0° die Nacht hindurch abgekühlt. Die Resultate zeigt die folgende Tabelle.

TABELLE X A.

Fettsäure	Lecithin- fettsäure	Gemischte Fettsäure	Stearin- säure	Palmitin- säure	Kontrolle. gesätt. Palmitin- säure.
angewandte Menge	0,3 g	0,3 g	0,15 g	0,15 g	
Ausscheidung	—	++++	++	++	—

TABELLE X B.

Fettsäure	Lecithin- fettsäure	Gemischte Fettsäure	Stearin- säure	Palmitin- säure	Kontrolle. gesättigte Lösung Palmitin- säure.
angewandte Menge	0,4 g	0,4 g	0,2 g	0,2 g	
Ausscheidung	—	++++	++	±	—

Versuch III. Dasselbe Verfahren wie im Versuch II. Die Ergebnisse finden sich in folgender Tabelle verzeichnet:

TABELLE X C.

Fettsäure	Lecithin- fettsäure	Gemischte Fettsäure	Stearin- säure	Palmitin- säure	Kontrolle. gesättigte Lösung Palmitin- säure.
angewandte Menge	0,6 g	0,4 g	0,2 g	0,3 g	
Ausscheidung	—	++++	++	++	—

Die obigen Versuchsergebnisse ergeben, dass bei den Versuchen mit der gemischten Fettsäure, der Stearin- oder der Palmitinsäure die betreffende Fettsäure ausgeschieden wird, aber bei denen mit der Lecithinfettsäure keine Ausscheidung stattfindet, woraus hervorgeht, dass in der letzteren keine oder nur wenig Palmitinsäure vorhanden ist.

Aus den Resultaten der obigen Versuche A) und B) ergibt sich, dass in der Lecithinfettsäure Stearin- und Palmitinsäure gar nicht vorhanden, oder wenn dies doch der Fall sein sollte, nur in verschwindend geringen Mengen vorhanden ist.

IV. AUSSCHIEDUNG AUS DER ALKOHOLISCHEN LÖSUNG.

In einer gewissen Menge absoluten Alkohols wurde eine gewisse Menge zu untersuchender Fettsäure gelöst, welche Lösung bei 0° eine Stunde lang abgekühlt und auf die daraus ausgeschiedene Fettsäure untersucht wurde.

Versuch I. Je 6g der Lecithinsäure (Schmelzpunkt 56°) und eines Gemenges (Schmelzpunkt 56°) von Stearin- und Palmitinsäure wurden einzeln in 120 ccm absoluten Alkohols gelöst.

Die Resultate zeigt Tabelle XI A.

TABELLE XI A.

Lecithinfettsäure		Gemischte Fettsäure	
Ausgeschiedenene Menge	Schmelzpunkt	Ausgeschiedenene Menge	Schmelzpunkt
1,5 g	56°	2,5 g	61,5°

Versuch II. Je 2g nur Lecithinsäure bzw. gemischte Fettsäure wurden in 45 ccm absol. Alkohols gelöst, mit welcher Lösung experimentiert wurde. Die Resultate sind folgende: (Tabelle XI B):

TABELLE XI B.

Lecithinfettsäure		Gemischte Fettsäure	
Ausgeschiedenene Menge	Schmelzpunkt	Ausgeschiedenene Menge	Schmelzpunkt
0,5 g	57°	1,0 g	66°

Nach den obigen Resultaten liegt der Schmelzpunkt der aus-
geschiedenen Fettsäure bei der gemischten Fettsäure bei $61,5-66,0^{\circ}$,
was erkennen lässt, dass sie zum grössten Teil aus Stearinsäure,
zum kleineren Teil aus Palmitinsäure besteht, aber bei der Lecithin-
fettsäure bei $56-57^{\circ}$, ein Schmelzpunkt, welcher nicht verschieden
von dem der ursprünglichen Fettsäure ist. Also muss wohl die
Lecithinfettsäure Stearin- und Palmitinsäure gar nicht oder in
nur geringer Menge enthalten und zum grössten Teil aus einer
Fettsäure mit dem Schmelzpunkt bei $56-57^{\circ}$ bestehen.

V. FRAKTIONIERTER DESTILLATION DES METHYLESTERS.

Zur Trennung der verschiedenen Fettsäuren wird heutzutage
die Fraktion der Methylester derselben häufig angewendet. Auch
ich untersuchte nach dieser Methode die Lecithinfettsäure und ein
Gemenge von Stearin- und Palmitinsäure, um die Resultate mit
einander zu vergleichen.

A) Die Darstellung der Methylester: 15g zu untersuchender
Fettsäure wurden in einer gemischten Lösung von 40 ccm Methyl-
alkohol, 2,5% Salzsäure enthaltend, und 50 ccm Äther gelöst, 12
Stunden lang erhitzt, um nach der Hallerschen Methode den
Methylester darzustellen.

B) Ich fraktionierte zuerst den Methylester der Mischung
von Stearin- und Palmitinsäure, um darauf zu untersuchen, aus
welcher Fraktion eine von beiden Säuren in grösserer Menge zu
gewinnen sei. Der Versuch wurde unter einem Luftdruck von
5 mm Hg vorgenommen. Die Resultate sind folgende:

TABELLE XII A.

	Fraktionstemperatur	Schmelzpunkt
Fraktion I	$145-155^{\circ}$	$55,5-56,0^{\circ}$
Fraktion II	$155-160^{\circ}$	$56,0-56,5^{\circ}$
Fraktion III	$160-170^{\circ}$	$68,0-68,5^{\circ}$

Die obigen Versuchsergebnisse zeigen, dass die Fettsäuren aus den Fraktionen I und II bei 55,–56,5° schmelzen und dass die Stearin- und Palmitinsäure in fast gleichen Mengen gewonnen werden, dass dagegen die Fettsäure aus der Fraktion III bei 68–68,5° schmilzt und zum grössten Teil aus Stearinsäure besteht.

C) Darauf wurde der Methylester der Lecithinfettsäure fraktioniert.

TABELLE XII B.

	Fraktionstemperatur	Schmelzpunkt
Fraktion I	145–155°	55,5°
Fraktion II	155–160°	56,5°
Fraktion III	160–170°	59,0°

Nach diesen Resultaten schmilzt die Fettsäure aus der Fraktion III bei 59°, welcher Schmelzpunkt sehr verschieden von dem der Fettsäure aus der mit der schon erwähnten gemischten Fettsäure ausgeführten Fraktion III ist, woraus man erkennen kann, dass in der Lecithinfettsäure nur wenig Stearinsäure enthalten ist, wenn überhaupt.

VI. UNTERSUCHUNG AUF STEARIN- UND PALMITINSÄURE

Aus obigen Resultaten stellt sich heraus, dass die Lecithinsäure keine oder doch nur wenig Stearin- und Palmitinsäure enthält. Auf das letztere hin habe ich noch folgende Versuche angestellt:

A) Untersuchung auf Stearinsäure.

1) 30 g Lecithinsäure wurden in 150 ccm Butylalkohol bei 60° gelöst und nach einstündiger Abkühlung bei 0° abfiltriert. Die Ausbeute betrug etwa 19 g, der Schmelzpunkt liegt bei 57°.

2) Diese Menge (19 g) wurde in 120 ccm Butylalkohol (60°) gelöst, bei 0° eine Stunde lang abgekühlt und abfiltriert.

Die Ausbeute betrug etwa 7 g, der Schmelzpunkt liegt bei 57°.

3) Diese Menge (7 g) wurde wieder in 50 cem Butylalkohol (60°) gelöst, bei 0° eine Stunde lang abgekühlt und abfiltriert.

Ausbeute etwa 3 g; Schmelzpunkt 59°.

4) Diese Menge (3 g) wurde in 40 cem Butylalkohol bei 60° gelöst, bei 0° eine Stunde lang abgekühlt und abfiltriert.

Die Ausbeute betrug ca. 2 g, der Schmelzpunkt war 60°.

5) Diese Menge (ca. 2 g) wurde in 30 cem 80%igen Äthylalkohols (80°) gelöst und nach Abkühlung abfiltriert.

Die ausgeschiedene Menge betrug etwa 1 g; Schmelzpunkt 65°.

6) Diese Menge (etwa 1 g) wurde in 20 cem 80%igen Äthylalkohols bei 80° gelöst, abgekühlt und abfiltriert.

Die Ausbeute betrug etwa 0.5 g, der Schmelzpunkt war 68°.

7) Diese Menge (0.5 g), in 15 cem 80%igen Äthylalkohols gelöst, bei 80° abgekühlt und abfiltriert, ergab eine ausgeschiedene Menge von etwa 0.2 g mit dem Schmelzpunkt 69°.

Eine kleine Menge Fettsäure, dadurch gewonnen, dass man eine grosse Menge Lecithinfettsäure 4-mal aus Butylalkohol und 3-mal aus Äthylalkohol umkrystallisiert hat, zeigt einen Schmelzpunkt von 69°. Die Elementaranalyse und die Bestimmung des Molekulargewichts der gewonnenen Fettsäure ergibt die aus folgender Tabelle ersichtlichen Resultate.

Die Tabelle zeigt, dass die Fettsäure mit dem Schmelzpunkt von 69° die Stearinsäure ist. Daraus ergibt sich also, dass Stearinsäure, wenn auch in kleiner Menge, in der Lecithinfettsäure enthalten ist.

TABELLE XIII A.

Elementaranalyse.

Nr.	Gewicht der Fettsäure (g)	H ₂ O (g)	CO ₂ (g)
1	0,1104	0,1272	0,3068
2	0,1081	0,1246	0,3012

Nr.	H%	C%
Gef., 1	12,80	75,79
2	12,81	75,99
Mittel	12,81	75,89
Berech. Stearinsäure	12,76	75,98

TABELLE XIII B.
Molekulargewicht (nach Acidimetrie).

Gewicht der Fettsäure (g)	Verbrauchte $\frac{n}{5}$ NaOH	Molekulargewicht
0,8520	15,00 ccm	284
Berech. Stearinsäure		284

B). Untersuchung auf Palmitinsäure.

Wie oben erwähnt, habe ich bewiesen, dass die Stearinsäure wenn auch in kleiner Menge, in der Lecithinsäure vorhanden ist. Ferner habe ich, um das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Palmitinsäure in derselben festzustellen, auch folgende Versuche vorgenommen:

Wenn die bei der fraktionierten Destillation des Methylesters von Lecithinfettsäure aus der Fraktion II abgeschiedene Fettsäure, ganz gesammelt, im 10 fachen Volumen von warmem Essigäthydrid gelöst, umkristallisiert, in Natriumseife verwandelt, und mittelst Aceton gereinigt wird, so erhält man eine kleine Menge Fettsäure, deren Schmelzpunkt bei 61.5° liegt.

Die Bestimmung des Molekulargewichts und die Elementaranalyse dieser Fettsäure ergibt die Resultate, welche Tabelle XIV zeigt.

Aus der Tabelle ist zu erkennen, dass diese Fettsäure Palmitinsäure ist, und dass Palmitinsäure, wenn auch in geringer Menge, in Lecithinsäure vorhanden ist.

TABELLE XIV A.
Elementaranalyse.

Gewicht der Fettsäure (g)	H ₂ O (g)	CO ₂ (g)
0,0896	0,1016	0,2454
	H%	C%
Gef.,	12,61	74,69
Berech. Palmitinsäure	12,58	74,93

TABELLE XIV B.
Molekulargewicht (nach Acidimetrie).

Gewicht der Fettsäure (g)	Verbrauchte $\frac{n}{5}$ NaOH	Molekulargewicht
0,3018	5,95 cem	253
Berech. Palmitinsäure		256

VII. UNTERSUCHUNG AUF ISOPALMITINSÄURE.

Schon die oben angestellten Versuche beweisen, dass die Lecithinsäure zwar Stearinsäure und Palmitinsäure in kleinen Mengen enthält, aber zum grössten Teil aus einer Fettsäure besteht, deren Schmelzpunkt 56–57° ist. Deshalb habe ich diese Fettsäure untersucht.

Die Elementaranalyse und die Bestimmung des Molekulargewichts der nach der oben angeführten Kreis und Hafner'schen Methode getrennten Fettsäure mit dem Schmelzpunkt von 57° ergibt die folgenden Resultate der Tabellen XV A, B.

Die Analyse der bei der fraktionierten Fällung durch Bleiacetat aus der Fraktion I (Tabelle II, B.) abgeschiedenen Fettsäure ergibt die Resultate der Tabelle XV, C.

TABELLE XV A.
Elementaranalyse.

Gewicht der Fettsäure (g)	H ₂ O (g)	CO ₂ (g)
0,1056	0,1212	0,2904
	H%	C%
Gef.	12,75	75,00
Berech. Palmitinsäure	12,58	74,93

TABELLE XV B.
Molekulargewicht (nach Acidimetrie).

Gewicht der Fettsäure (g)	Verbrauchte $\frac{n}{5}$ NaOH	Molekulargewicht
0,4732	9,10 ccm	260
Berech. Palmitinsäure		256

TABELLE XV C.
Elementaranalyse.

Gewicht der Fettsäure (g)	H ₂ O (g)	CO ₂ (g)
0,1325	0,1518	0,3623
	H%	C%
Gef.	12,68	74,56
Berech. Palmitinsäure	12,58	74,93

Nach obigen Resultaten stimmt die Fettsäure mit dem Schmelzpunkt von 57° in den Werten der Elementaranalyse und im

Molekulargewicht mit Palmitinsäure überein, ist aber im Schmelzpunkt beträchtlich verschieden von derselben.

Nach den Resultaten der nach Kreis u. Hafnerscher Methode angestellten Versuche ist die Löslichkeit der in Betracht kommenden Fettsäure in Alkohol kleiner als die der Palmitinsäure.

S. Kawase⁽³⁾ stellte aus Puppenöl vom Seidenspinner, J. Kato⁽⁴⁾ aus Puppenöl vom Eichenseidenspinner, und S. Suzuki⁽⁵⁾ aus Eigelböl Isopalmitinsäure dar. Meine oben erwähnten Resultate stimmen mit den Werten dieser Isopalmitinsäure überein. Die Fettsäure, die den grössten Teil der Lecithinfettsäure bildet, ist Isopalmitinsäure.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die oben erwähnten Untersuchungsergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

1) Der Schmelzpunkt einer gesättigten Fettsäure, die aus Eigelbleicithin gewonnen ist, ist 55–56,5°.

2) Bei der fraktionierten Fällung aus den alkoholischen Lösungen der gesättigten Lecithinfettsäuren durch Bleiacetat zeigen die aus den einzelnen Fraktionen abgeschiedenen Fettsäuren einen Schmelzpunkt von 55,5–57°, also fast keine Differenz von denen der Ursprungsfettsäure, woraus sich ergibt, dass diese nichts als Gemenge von Stearin- und Palmitinsäure anzusehen ist, sondern zum grössten Teil aus Fettsäuren mit dem Schmelzpunkt 55,5°–57° bestehen muss.

3) Die Versuche nach der Kreis und Hafnerschen Methode zeigen, dass sich keine Fettsäure abscheiden lässt, oder, wenn dies doch der Fall sein sollte, nur eine solche mit dem Schmelzpunkt von ca. 57°, der sehr wenig verschieden von dem der Ursprungsfettsäure ist. Dies zeigt, dass Lecithinfettsäure keine oder doch nur wenig Stearinsäure enthält, vielmehr zum grössten Teil aus einer Fettsäure mit dem Schmelzpunkt von ca. 57° besteht. Der Schmelzpunkt der im Filtrat nach Zusatz von Bleiacetat, (Filtrat II), enthaltenen Fettsäure zeigt eine geringe Steigerung, woraus

sich zeigt, dass in der Lecithinfettsäure Palmitinsäure in sehr geringen Mengen vorhanden ist.

4) Bei der Bestimmung der Stearin- und Palmitinsäure nach Hahner und Mitchellscher Methode findet man, dass beide Säuren in der Lecithinfettsäure nicht oder nur in geringen Mengen enthalten sind.

5) Fettsäuren, die aus einer alkoholischen Lösung der Lecithinfettsäure abgeschieden sind, schmelzen bei 56–57°. Daraus ergibt sich, dass die Lecithinfettsäure nicht aus einem Gemenge von Stearin- und Palmitinsäure, sondern zum grössten Teil aus einer Fettsäure besteht, deren Schmelzpunkt 56–57° ist.

6) Wenn der Methylester der Lecithinfettsäure der fraktionierten Destillation unterworfen wird, wird eine Fettsäure aus der Fraktion III, wo eigentlich der grösste Teil der Stearinsäure aufgefangen werden sollte, abgeschieden, deren Schmelzpunkt 59° zeigt und beträchtlich verschieden von dem der Stearinsäure ist. Daraus ist zu entnehmen, dass die Stearinsäure, wenn sie vorhanden sein sollte, nur in kleinen Mengen in der Lecithinfettsäure enthalten ist.

7) Aus 30 g Lecithinfettsäure, 4 Mal aus butylalkoholischen Lösungen und 3 Mal aus äthylalkoholischen Lösungen umkristallisiert, wird 0,2 g Fettsäure gewonnen. Die Werte der Elementaranalyse, des Molekulargewichts und des Schmelzpunkts dieser Fettsäure stimmen mit denen der Stearinsäure überein. Daraus erkennt man, dass die Stearinsäure, so gering ihre Menge auch ist, in der Lecithinfettsäure vorhanden ist.

8) Lecithinsäure in Essigäthydrat gelöst, nach Umkristallisation in Natriumseife verwandelt und mit Aceton gereinigt, ergibt eine Fettsäure, die in den Werten der Elementaranalyse, des Molekulargewichts und des Schmelzpunkts mit denen der Palmitinsäure übereinstimmt, woraus zu erkennen ist, dass die Palmitinsäure, so gering ihre Menge auch ist, in der Lecithinfettsäure ebenfalls enthalten ist.

9) Die Elementaranalysen einer Fettsäure, die aus der

Lecithinfettsäure nach Kreis und Häfnerscher Methode ab-
geschieden ist und den Schmelzpunkt von 57° zeigt, und einer
solchen, die durch fraktionierte Fällung mit Bleiacetat gewonnen
ist und bei $56,5\text{--}57^{\circ}$ schmilzt, stimmen beiderseits in den Resultaten
mit denen der Palmitinsäure überein; ebenso auch die Molekular-
gewichte. Nur der Schmelzpunkt der Ursprungsfettsäure weicht
beträchtlich von dem der Palmitinsäure ab, woraus man schliessen
kann, dass diese Fettsäure ganz der Isopalmitinsäure entspricht.

SCHLUSS.

Aus obigen Resultaten kann der Schluss gezogen werden, dass
die aus Eigelbleicithin dargestellte gesättigte Fettsäure zwar eine
kleine Menge Stearin- und Palmitinsäure enthält, aber zum grössten
Teil aus Isopalmitinsäure besteht.

Zu den Kosten unserer Arbeit ist vom Verein zur Erinnerung
an das 300 jährige Jubiläum des Toshogu beigesteuert worden.

LITERATUR.

Kato: J. Agricul. Chem. Societ. Japan, **1**, 679.

Kawase: J. Chem. Societ. Japan, **42**, 3.

Levene u. Rolf: J. Biol. Chem., **46**, 193.

Sueyoshi: J. Biochem. **13**, 145.

Suzuki: J. Agricul. Chem. Societ. Japan, **3**, 530.

ÜBER DIE FETTSÄUREN DES EIGELBLECITHINS.

II. Mitteilung. Die ungesättigten Fettsäuren.

VON

YUJI SUEYOSHI UND TOMIJI FURUKUBO.

(Aus dem mediz.-chemischen Institut der Keio-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Teruuchi.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1930)

EINLEITUNG.

Über ungesättigte Fettsäuren des Eigelblecithins sind bisher viele Untersuchungen angestellt worden, von denen die von Levene und Rolf (1922) die eingehendsten sind. Aus ihren Resultaten ergibt sich, dass die im Eigelblecithin enthaltenen ungesättigten Fettsäuren Olein-, Linol- und Arachidonsäure sind. Um das Mengenverhältnis der einzelnen ungesättigten Fettsäuren genauer zu bestimmen, habe ich die folgenden Versuche vorgenommen.

TRENNUNG DER UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN.

Wie schon bei der Trennung der gesättigten Fettsäuren⁽²⁾ erwähnt, wurden die ungesättigten Fettsäuren nach der Bleisalz-Äther Methode getrennt. Die Jodzahl (nach Wijs) betrug 115 und eine durch Hydrierung mit Platinmohr entstandene Fettsäure zeigte einen Schmelzpunkt von 61,5–62,5° und ein Molekulargewicht von 296.

Zur Trennung der einzelnen ungesättigten Fettsäuren sind zunächst Bromderivate hergestellt worden, und die Trennung geschah durch die verschiedene Löslichkeit der Bromderivate der einzelnen Fettsäuren in jedem Lösungsmittel.

Die ungesättigten Fettsäuren wurden in Äther gelöst, nach

langsamem Zusatz von Brom unter Abkühlung bei 0° über Nacht stehen gelassen, und dann der Niederschlag abfiltriert. Da der Niederschlag Polybromide vorstellt, wurde warmes Benzol zugezetzt, und das Extrakt abgedampft, und zwar ohne dass ein Rückstand blieb.

Daraus ist zu erkennen, dass in den ungesättigten Fettsäuren kein Hexabromid, d. h. keine der Linolsäurereihe angehörige ungesättigte Fettsäure enthalten ist, dass also die hier in Rede stehenden Polybromide zu den 8 oder mehr Bromiden gehören.

UNTERSUCHUNG DER POLYBROMIDE.

Die so getrennten Polybromide wurden bei 200° etwas schwarz und bei 240° zersetzt.

Die Bestimmung des Bromgehalts der Polybromide nach Baubigny und Chavanne ergab 70.03% Bromgehalt, woraus hervorgeht, dass der zu untersuchende Stoff mehr der Formel $C_{22}H_{34}O_2Br_{10}$ (Bromgehalt 70.76%) entspricht, als der $C_{20}H_{22}O_2Br_8$ (Bromgehalt 67.76%).

Wurden 10 g Polybromide zerquetscht, in 100 ccm Eisessig suspendiert, nach Zusatz von 20 g Zinkpulver unter einer Leitung von CO_2 Gas stundenlang erhitzt, und das Filtrat im Vakuum abgedampft, hier durch der Eisessig entfernt, Wasser und eine kleine Menge HCl dazu zugesetzt, mit Chloroform extrahiert, und dann das Wasser dem letzteren durch Natrium-sulfat-anhydrid entzogen, und wieder im Vakuum abgedampft, so wurde eine hoch ungesättigte Fettsäure frei von Brom gewonnen. Mit der so gewonnenen ungesättigten Fettsäure wurden die Jodzahl (nach Wijs) und das Molekulargewicht (durch Acidimetrie) bestimmt. Da die hoch-ungesättigte Fettsäure leicht oxydierbar ist, so wird unzweifelhaft die Jodzahl durch ein Verfahren wie die Debromination mehr oder weniger verkleinert.

Die Hydrierung der Säure mittels Platinmohrs wurde auch vorgenommen, und die Natur der gewonnenen gesättigten Fettsäure wurde untersucht.

Wie die Tabelle I zeigt, stimmt die von mir dargestellte hydrierte Fettsäure in den Werten der Elementaranalyse und im Molekulargewicht mit der Behensäure (hydrierte Clupanodonsäure) fast überein, zeigt auch einen Schmelzpunkt, der höher ist, als der der Arachinsäure (hydrierte Arachidonsäure), und der bei wiederholter Umkristallisation auf 80° steigt, woraus zu schliessen ist, dass diese Fettsäure ohne Zweifel Behensäure ist.

TABELLE I.

	Gefunden	Werte für	
		Clupanodonsäure	Arachidonsäure
Jodzahl (Wijs)	322	383	305
Molekulargewicht	315	330	304
Schmelzpunkt der hydrierten Säure	78°	84°	77°
Molekulargewicht der hydrierten Säure	319	340	312
C- u. H-gehalt der hydrierten Säure	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 77.73\% \\ \text{H } 13.59\% \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 77.58\% \\ \text{H } 13.03\% \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 76.84\% \\ \text{H } 12.91\% \end{array} \right.$

Sie besteht nun zwar hauptsächlich aus Behensäure, aber sie ist wohl mit mehr oder weniger Arachinsäure gemischt. Denn sie lässt aus der Steigerung ihres Schmelzpunktes durch wiederholte Umkristallisation erkennen, dass sie nicht nur aus Behensäure besteht, sondern mit einer anderen Fettsäure gemischt ist, was daher kommt, dass die ungesättigten Fettsäuren, die sich in 8- oder mehr Bromiden finden, Arachidon- und Clupanodonsäure sind, aus deren ersterer die Arachinsäure, aus deren letzterer die Behensäure gebildet wird.

Aus der Zusammenfassung der obigen Resultate ergibt sich, dass die ungesättigte Fettsäure, die Polybromide bildet, hauptsächlich aus Clupanodonsäure besteht, aber auch in gewissem Masse mit Arachidonsäure gemischt ist.

UNTERSUCHUNG DER TETRABROMIDE.

Bei Zusatz von Petroläther zu der schon bromierten und in Äther gelösten Fettsäure entstand ein Niederschlag, Tetrabromid, und so wurde dieses vom Dibromid getrennt.

Der Schmelzpunkt eines so getrennten Tetrabromides ist 110–112°. Die Brombestimmung mit diesem Material ergab 54,54%, entsprechend $C_{18}H_{32}O_2Br_4$ (berechnet: 53.33% Br).

Nach derselben Methode wie bei den Polybromiden erfolgte die Debromierung, wozu folgende Versuche ausgeführt wurden:

TABELLE II.

	Gefunden	Werte für Linolsäure
Jodzahl (Wijs)	189	181
Molekulargewicht	273	280
Schmelzpunkt der hydrogenierten Säure	64,5°	69,3°
Elementaranalyse der hydrogenierten Säure	$\begin{cases} \text{C } 76.51\% \\ \text{H } 13.28\% \end{cases}$	$\begin{cases} \text{C } 75.98\% \\ \text{H } 12.76\% \end{cases}$

Die obigen Resultate werden dahin zusammengefasst, dass die ungesättigte Fettsäure, welche sich in den 4-Bromiden findet, Linolsäure ist.

UNTERSUCHUNG DER DIBROMIDE.

Die gesättigte Fettsäure wurde, da eine kleine Menge davon in dem Petroläther, durch welchen die Trennung der oben beschriebenen Tetrabromide stattfand, enthalten war, nach Debromierung in Bleiseife verwandelt, welche nach Zusatz des 3 fachen Volumens Gypus mit absolutem Äther extrahiert und dann mit Salzsäure angesäuert, worauf Abdampfung des Ätherextraktes folgte.

Das Ergebnis der Untersuchung der so gewonnenen Fettsäure ist folgendes:

TABELLE III.

	Gefunden	Werte für Ölsäure
Jodzahl (Wijs)	125	90
Molekulargewicht	287	282
Schmelzpunkt der hydrogenierten Säure	65°	69°
Molekulargewicht der hydrierten Säure	285	284
Zusammensetzung hydrierten Säure	{ C 76.73% H 13.06%	{ C 75.98% H 12.76%

Bei der Übersicht über die obigen Resultate findet sich, dass die hier in Rede stehende Fettsäure in den Untersuchungsergebnissen, mit Ausnahme der Jodzahl, mit der Öl- oder Stearinsäure übereinstimmt, dass also die ungesättigte Fettsäure, die Dibromide bildet, Ölsäure ist, während die Jodzahl zu gross ist, um die Fettsäure als Ölsäure aufzufassen. Das ist wohl darauf zurückzuführen, dass der Ölsäure Linolsäure beigemischt ist, da Tetra-bromide in einem gewissen Masse in Petroläther gelöst werden.

DAS MENGENVERHÄLTNISS DER EINZELNEN BROMIDE.

Die Menge der einzelnen Bromide, nach der erwähnten Methode gethennt, zeigt in einem Versuchsfalle die folgende Werte:

Ungesättigte Fettsäure (8.6 g) wurde in 90 cem Äther gelöst und bromiert.			
lösliche Subst.		unlösliche Subst.	
(10.4 g)		(1.3 g)	
50 cem Petroläther zugesetzt.		15 cem Benzol zugesetzt.	
lös. Subst.	unlös. Subst.	lös. Subst.	unlös. Subst.
(10 g)	(0.4 g)	(0)	(1.3 g)
(Dibromid)	(Tetrabromid)		(Polybromid)

Die Mengen der einzelnen ungesättigten Fettsäuren, aus diesen Bromidmengen berechnet, ergeben sich wie folgt: Ölsäure, 6,3 g. 73,2%, Linolsäure, 0,18 g. 2,1% Clupanodonsäure 0,44 g 5,1%.

Daraus kann man annehmen, dass die ungesättigte Fettsäure zum grössten Teil aus Ölsäure gebildet ist, der Clupanodonsäure als zweiter, Linolsäure als dritter Bestandteil folgt. Es ist eine interessante Tatsache, dass die Clupanodonsäure, welche eine im Fischöl enthaltene Fettsäure ist, in Phosphatid aus Eigelb in grösseren Mengen vorhanden ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die obigen Resultate werden kurz zusammengefasst, wie folgt:

1. Unter den Polybromiden, die von den ungesättigten Fettsäuren aus Eigelblecithin getrennt werden, findet sich kein Hexabromid.

2. Der Bromgehalt der Polybromide beträgt 70,03%. Seine Formel steht $C_{22}H_{34}O_2Br_{10}$ nahe.

3. Die Zahlen in den Versuchen mit einer aus Polybromiden dargestellten Fettsäure zeigen uns die Tatsache, dass die ungesättigte Fettsäure aus Polybromiden hauptsächlich aus Clupanodonsäure besteht. Da aber der Schmelzpunkt der hydrogenierten Fettsäure bei jeder Umkristallisation steigt, ist zu schliessen, dass die Fettsäure nicht nur aus Clupanodonsäure, sondern auch aus Arachidonsäure besteht; denn wenn die ungesättigte Fettsäure aus Polybromiden eine andere Fettsäure enthalten sollte, als die Clupanodonsäure, so muss diese andere die Arachinonsäure sein, da unter den Polybromiden kein Hexabromid vorhanden ist.

4. Der Bromgehalt des Tetrabromides beträgt 54,54% ($C_{18}H_{32}O_2Br_4$, Br-Gehalt, 53,33%).

5. Die Untersuchung über die aus Tetrabromid dargestellte Fettsäure ergab die Resultate, dass die ungesättigte Fettsäure Linolsäure ist.

6. Untersuchungen über die aus Dibromid durch Debromierung gewonnene Fettsäure ergaben die Resultate, dass die ungesättigte Fettsäure aus Dibromid zum grössten Teil Ölsäure vorstellt.

Die Mengen der einzelnen ungesättigten Fettsäuren des

Lecithin, aus denen der einzelnen Bromide berechnet, sind folgende: Ölsäure 73.2%, Clupanodonsäure 5.1%, Linolsäure 2.1%.

SCHLUSS.

Die ungesättigten Fettsäuren aus Eigelblecithin bestehen zum grössten Teil aus Ölsäure, welcher die Clupanodonsäure als zweiter, und die Linolsäure als dritter Bestandteil folgt.

Hoch ungesättigte Fettsäuren, wie Clupanodonsäure, waren sonst nur im Fischöl bekannt, aber interessanterweise werden sie jetzt auch im Eigelblecithin in grossen Mengen gefunden.

Zu den Kosten unserer Arbeit ist von Verein zur Erinnerung an das 300 jährige Jubiläum des *Toshogu* beigesteuert worden.

LITERATUR.

Levene u. Rolf: J. Biol. Chem. 51, 507.

Sueyoshi u. Furukubo: J. Biochem. 13, 155.

ÜBER DEN GEHALT DER GEWEBE AN FETTSÄUREN UND UNVERSEIFBAREN SUBSTANZEN UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN.

VON

TOMIJI FURUKUBO.

(Aus dem mediz.-chemischen Institut der Keio-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Teruuchi.)

(Eingegangen am 12. Januar 1931)

EINLEITUNG

Die Schwankung des Lipoidgehalts des Blutes unter verschiedenen Bedingungen ist von vielen Autoren erforscht worden. Aber selten sind in wenigen oder besonderen Fällen über die Veränderung des Lipoidgehalts der Gewebe Studien gemacht worden, noch seltener über die Veränderungen der unverseifbaren Substanzen. Daher ist eine systematische Untersuchung dieser Veränderung in verschiedenen Fällen sehr wichtig für das Studium des Lipoidstoffwechsels. Das hat mich zur folgenden Arbeit veranlasst.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODE.

Als Versuchstiere wurden männliche Kaninchen verwendet. Die Lipoidbestimmung erfolgte an Muskel- Leber- und Nierengewebe.

Quantitative Bestimmung: Die Menge der Fettsäure wurde nach der Kumagawa-Sutoschen Methode bestimmt. Bei der Verseifung nach dieser Methode wurde Alkohol bis zu $\frac{1}{3}$ des Volumens zugesetzt. Auch kam zum Austrocknen von Äther und Petrolätherextrakt der Vakuumverdampfungsapparat von Kakiuchi (1909) zur Verwendung. *Unverseifbare Substanzen:* Die unverseifbaren Substanzen wurden ebenfalls nach der Kumagawa-

Sutosen Methode bestimmt, mit deren Chloroformlösung nach Liebermann und Burchard das Cholesterin bestimmt wurde. Als Menge der unbekannten unverseifbaren Substanzen wurde das nach Abzug des Cholesterins von der Gesamtmenge der unverseifbaren Substanzen übriggebliebene angesehen.

I. Normale Kaninchen.

Bei den Kaninchen, die pro Kilo Körpergewicht mit 100 g Okara und 4 g Gemüse gefüttert worden waren, wurde jedes Gewebe der Analyse unterworfen. Die Resultate sind folgende:

TABELLE I.

	Kanin- chen Nr.	Fettsäure %	unver- seifbare Subst. %	Choles- terin %	unbe- kannte Subst. %	Cholesterin unbekannte Subst
Muskel	1	0.738	0.137	0.042	0.095	0.442
	2	0.791	0.132	0.038	0.094	0.404
	3	0.600	0.126	0.037	0.089	0.415
	Mittel	0.710	0.132	0.039	0.093	0.420
Leber	1	2.70	0.285	0.121	0.163	0.742
	2	2.66	0.288	0.184	0.103	1.786
	3	2.39	0.409	0.206	0.199	1.035
	Mittel	2.58	0.327	0.170	0.155	1.188
Niere	1	2.47	0.446	0.209	0.237	0.882
	2	2.08	0.569	0.272	0.297	0.916
	3	1.73	0.481	0.199	0.282	0.706
	Mittel	2.09	0.499	0.227	0.272	0.835

In der Leber und der Niere zeigen Cholesterin und unbekannte unverseifbare Substanzen eine wenig verschiedene Menge, aber im Muskel ist die der letztern grösser als die des ersteren. Diese Tatsache hat Igarashi (1928) auch festgestellt.

II. *Hungernde Kaninchen.*

Den Kaninchen wurde nur Wasser gegeben. Die Analysenresultate sind aus der folgenden Tabelle zu ersehen:

Die Vergleichung dieser Resultate mit denen bei den normalen Kaninchen ergibt folgendes:

Muskel: Die Fettsäure ist deutlich vermindert, die Menge der unverseifbaren Substanzen ebenfalls. Die unverseifbaren Substanzen, getrennt nach Cholesterin und unbekannte unverseifbare Substanzen betrachtet, zeigen, dass die Menge des ersteren die Neigung hat etwas zuzunehmen, dass aber die der letzteren deutlich herabgesetzt wird. Daher steigt der Quotient Cholesterin/unbek. Subst. bei den hungernden Kaninchen auf 0,892, während er bei den normalen Kaninchen 0,501 beträgt.

Leber: Die Menge der Fettsäure ist fast unverändert, aber die unverseifbaren Subst. haben die Neigung sich etwas zu vermehren.

Diese Vermehrung beruht nur auf der von Cholesterin; die unbekannten Substanzen bleiben konstant.

Niere: Die Fettsäuremenge ist unverändert, die unverseifbaren Substanzen sind vermindert. Diese Verminderung ist auf die der unbekannten Substanzen, aber nicht auf die des Cholesterin zurückzuführen, dieses neigt eher sogar zur Vermehrung. Daher ergibt Cholesterin/unbek. Subst. in diesem Falle eine Vermehrung auf 1,38, während sich bei den normalen Kaninchen eine solche auf 0,84 findet.

Die oben erwähnten Resultate werden folgendermassen zusammengefasst:

Bei den hungernden Kaninchen zeigt die Fettsäure eine Verminderung beim Muskel, aber keine bei der Leber und Niere. Die unverseifbaren Substanzen sind bei Muskel und Niere vermindert, bei der Leber vermehrt. Wenn man sie gesondert in Cholesterin und unbekannte Substanzen betrachtet, so findet man, dass die letzteren bei Muskel und Niere deutlich vermindert und bei der

TABELLE II.

	Kanin- chen Nr.	Fettsäure %	unver- seifbare Subst. %	Choles- terin %	unbe- kannte Subst. %	Cholesterin unbekannte Subst.
Muskel	7	0.559	0.085	0.045	0.041	1.098
	8	0.668	0.152	0.028	0.124	0.226
	9	0.638	0.120	0.059	0.061	0.739
	Mittel	0.622	0.119	0.044	0.075	0.688
Leber	7	3.20	0.219	0.147	0.071	2.070
	8	2.61	0.502	0.286	0.257	1.074
	9	2.26	0.335	0.202	0.134	1.507
	Mittel	2.69	0.352	0.212	0.154	1.550
Niere	7	2.52	0.310	0.126	0.184	0.685
	8	1.81	0.410	0.390	0.188	2.075
	9	1.73	0.394	0.245	0.148	1.655
	Mittel	2.02	0.371	0.254	0.173	1.472

Körpergewicht.

Nr.	Hungerdauer (Tage)	Körpergewicht (g.)		
		Vor. d. Experim.	Nach d. Experim.	Verlust.
7	20	2580	1630	950
8	19	2320	1380	940
9	19	2320	1330	990
Mittel		2467	1447	960

Leber unverändert sind, während das Cholesterin bei Leber und Niere etwas vermehrt ist, was auch von Morita (1924) und Lawaczek () erkannt worden ist.

Man findet beim Hunger zwar ein Gewebe mit vermehrtem Cholesterin und mit verminderten unbekannten Substanzen, aber keines mit vermindertem Cholesterin und mit vermehrten unbekannten Substanzen. Dass sich die unbekannten Substanzen beim Hungern vermindern, ist eine interessante Tatsache.

III. Mit Olivenöl injizierte Kaninchen.

Den Kaninchen, welche auf dieselbe Weise wie die normalen gefüttert worden waren, wurden 5 ccm Olivenöl pro Kilo Körpergewicht subkutan injiziert. Diese Versuche wurden zum Teil zur Kontrolle gegen die unten zu beschreibenden VitaminA-Versuche vorgenommen; daher wurde das Olivenöl mit Zusatz von Cholesterin im Verhältnis von 12 mg/dl. gebraucht. Denn das von mir verwendete Vitamin A, in Olivenöl gelöst, enthielt die oben erwähnte Cholesterinmenge. Die Versuchsergebnisse zeigt die folgende Tabelle III.

Aus der Tabelle ergibt sich folgendes:

Muskel: Die Fettsäure ist vermindert. Da die Injektion einer grossen Menge Olivenöl die sog. Ölvergiftung hervorruft, muss dies wohl auch in diesen Fällen erfolgt sein, was auch aus einer starken Verminderung des Körpergewichts zu ersehen ist. Die unverseifbaren Substanzen sind vermehrt; das ist einer Vermehrung des Cholesterins und der unbekannten unverseifbaren Substanzen zuzuschreiben. Diese Vermehrung scheint wohl durch das zum Olivenöl zugesetzte Cholesterin und die im Öl enthaltenen unbekannten unverseifbaren Substanzen entstanden zu sein.

Leber: die Fettsäuremenge bleibt fast unverändert. Die unverseifbaren Substanzen, d.i. Cholesterin und unbekannte Substanzen, sind vermehrt, wie bei dem Muskel.

Niere: die Fettsäuremenge ist unverändert; die unverseifbaren Substanzen, das Cholesterin und die unbekannten Substanzen, sind ebenso vermehrt, wie in den anderen Geweben.

Die Zusammenfassung der obigen Resultate ergibt: dass die Fettsäure in Organen wie Leber und Niere nicht vermindert, aber

TABELLE III.

	Kanin- chen Nr.	Fettsäure %	unver- seifbare Subst. %	Choles- terin %	unbe- kannte Subst. %	Cholesterin unbekannte Subst.
Muskel	10	0.537	0.144	0.042	0.103	0.408
	11	0.715	0.198	0.058	0.140	0.414
	Mittel	0.626	0.171	0.050	0.122	0.411
Leber	10	2.32	0.400	0.226	0.175	1.291
	11	2.50	0.538	0.367	0.171	2.146
	Mittel	2.41	0.469	0.297	0.173	1.719
Niere	10	1.38	0.836	0.357	0.479	0.745
	11	2.67	0.760	0.381	0.378	1.008
	Mittel	2.03	0.798	0.369	0.429	0.877

Körpergewicht.

Nr.	Versuchsdauer. (Tage)	Körpergewicht (g)		
		Vor d. Exp.	Nach d. Exp.	Ab- u. Zunahme.
10	12	2810	2850	+ 40
11	13	3000	3100	+100
Mittel		2905	2975	+ 70

bei den Muskeln herabgesetzt ist, was vielleicht eine Folge der Ölvergiftung ist, und dass die unverseifbaren Substanzen und zwar das Cholesterin und die unbekannten Substanzen in allen Geweben bedeutend vermehrt sind. Die Resultate der Untersuchungen, welche Morita ausführte, nachdem er Kaninchen täglich Cholesterin gegeben hatte, zeigten, dass das Cholesterin in allen Geweben vermehrt wird. Daraus erhellt, dass die sich in meinen Versuchen zeigende Vermehrung des Cholesterin durch

das zum Olivenöl zugesetzte Cholesterin hervorgerufen worden ist. Auch die Zunahme der unbekannten unverseifbaren Substanzen in allen Geweben scheint darauf zurückzuführen, dass dieselben im Olivenöl enthalten sind.

*IV. Mit Vitamin A (Biosterin) injizierte
Kaninchen.*

Dass die überschüssige Injektion von Vitamin A (Biosterin) den Fettstoffwechsel zur Veränderung bringt, ergibt sich aus den Versuchen von Sugata (1929). Daher wurde hier der Lipidgehalt jedes Gewebes gemessen. Das von mir verwendete Vitamin A war in Olivenöl gelöst, und die Lösung war auch Vitamin D haltig. Das Präparat enthielt ausser Cholesterin (12mg/dl) noch

TABELLE IV.

	Kanin- chen Nr.	Fettsäure %	unver- seifbare Subst. %	Choles- terin %	unbe- kannte Subst. %	Cholesterin unbekannte Subst.
Muskel	12	0.64	0.123	0.041	0.082	0.500
	13	0.83	0.157	0.047	0.110	0.427
	14	0.94	0.192	0.065	0.127	0.512
	Mittel	0.80	0.157	0.051	0.106	0.480
Leber	12	2.82	0.397	0.229	0.168	1.363
	13	3.07	3.300	0.182	0.119	1.529
	14	2.90	0.368	0.252	0.116	2.172
	Mittel	2.93	0.355	0.221	0.134	1.688
Niere	12	1.96	0.625			
	13	2.46	0.613	0.245	0.368	0.666
	14	2.33	0.522	0.238	0.284	0.838
	Mittel	2.25	0.587	0.242	0.326	0.752

Körpergewicht.

Nr.	Versuchsdauer. (Tage)	Körpergewicht (g)		
		Vor d. Exp.	Nach d. Exp.	Ab- u. Zunahme
12	10	2590	2270	- 320
13	11	2610	2300	- 310
14	10	2620	2220	- 400

unbekannte unverseifbare Beimischungen. Davon wurden den mit dem schon erwähnten Futter gefütterten Kaninchen täglich 5ccm pro Kilo Körpergewicht subkutan injiziert. Die Analysenresultate sind folgende:

Körpergewicht: Nach den Versuchen von Sugata soll das Vitamin A (Biosterin) bei Kaninchen, wenn es in bestimmten Mengen injiziert wird, eine allmähliche Vermehrung des Unterhautfettgewebes und damit die Zunahme des Körpergewichts erzeugen, aber wenn es weiter in überschüssigen Mengen gegeben wird, keine weitere Erhöhung desselben herbeiführen, sondern die Tiere stark abmagern lassen und in kurzer Zeit zum Tode führen. Meine Versuche ergaben in allen Fällen zwar nicht den Tod, aber eine bedeutende Verminderung des Körpergewichts, was ohne Zweifel durch die Verabreichung der grossen Menge Vitamin A (Biosterin) verursacht war.

Muskel: Die Fettsäure vermehrte sich, wie oben erwähnt, ungeachtet einer starken Verminderung des Körpergewichts in weit höherem Grade als bei den normalen Kaninchen, während sie, wie wir sahen, bei der Olivenölinjektion abnahm. Daraus ist klar zu erkennen, dass das Vitamin A (Biosterin) die Ablagerung des Fettes begünstigt.

Auch die unverseifbaren Substanzen nahmen zu; das Cholesterin und die unbekannten Substanzen waren beide vermehrt wie bei der schon geschilderten Olivenölinjektion.

Leber: Die Fettsäuremenge hatte die Neigung etwas zuzu-

nehmen. Von den unverseifbaren Substanzen zeigte das Cholesterin eine deutliche Vermehrung.

Niere: Auch hier war die Fettsäure geneigt, sich etwas zu vermehren. Von den unverseifbaren Substanzen war das Cholesterin in geringem, aber die unbekannten Substanzen in höherem Grade vermehrt.

Die Zusammenfassung der obigen Resultate ergibt, dass bei den Tieren ungeachtet der Abnahme des Körpergewichts die Fettsäure im allgemeinen Neigung zur Vermehrung zeigt, und dass diese beim Muskel am stärksten ist. Besonders zeigt sich auch, dass die Injektion von Olivenöl allein eine bedeutende Abnahme des Fettes ergibt, die Anwesenheit von Vitamin A aber eine starke Vermehrung desselben bewirkt. Auch Sugata lieferte den Beweis dafür, dass bei mit überschüssigem Vitamin A injizierten Kaninchen ihr Organfett sich vermehrt. Es folgt aus dieser Tatsache, dass das Vitamin A die Ablagerung des Fettes begünstigt. Von den unverseifbaren Substanzen vermehren sich das Cholesterin und die unbekannten Substanzen im Muskel; das erstere auch in den anderen Organen. Diese Vermehrung ist wohl darauf zurückzuführen, dass in dem Injektionsmaterial diese Substanzen gemischt vorhanden sind.

V. *Adrenalininjizierte Kaninchen.*

Die Rindensubstanz der Nebenniere enthält Cholesterin in grosser Menge. Über die Erklärung dieser Tatsache sind die Meinungen geteilt. Die Aschoffsche Schule spricht dieses Gewebe als Depotstätte des Cholesterins, Chauffard und seine Anhänger als Hauptbildungsstätte desselben an, sodass keine bestimmten Aufschlüsse gegeben sind. Aber es ist allgemein anerkannt, dass die Nebenniere im Cholesterinstoffwechsel eine grosse Rolle spielt. Morita bestimmte bei hungrigen Kaninchen, denen Adrenalin injiziert wurde, den Gehalt der einzelnen Gewebe an Fettsäuren und Cholesterin und fand dabei eine Verminderung dieser beiden Substanzen.

Wertheimer (1926) nahm an, dass die Injektion von Adrenalin bei Phlorhidinhunden eine weit stärkere Hyperglykämie verursacht als bei normalen Tieren, und schloss daraus, dass die Umwandlung von Fett in Kohlenhydrat durch Adrenalin begünstigt wird. Das Adrenalin übt also einen grossen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel aus.

Das hat mich zur Bestimmung des durch die Zufuhr von Adrenalin veränderten Lipoidgehaltes der Gewebe veranlasst. Die Versuche wurden dergestalt vorgenommen, dass mit der schon beschriebenen Kost gefütterten Kaninchen 1 mg Adrenalinchlorid (SANKYO) täglich subkutan eingespritzt wurde. Die Resultate zeigt die folgende Tabelle.

Muskel: Die Fettsäure ist im Vergleich zu der bei normalen Kaninchen vermehrt, was zeigt, dass das Adrenalin die Ablagerung

TABELLE V.

	Kanin- chen Nr.	Fettsäure 1%	Unver- seifbare Subst. %	Choleste- rin %	Unbe- kannte Subst. %	Cholesterin
						Unbekannte Subst.
Muskel	15	0.605				
	16	0.829	0.128	0.040	0.088	0.455
	17	1.109	0.172	0.045	0.127	0.354
	Mittel	0.848	0.150	0.043	0.108	0.405
Leber	15	2.73	0.349	0.231	0.117	1.960
	16	2.96	0.343	0.174	0.169	1.066
	17	2.78	0.465	0.258	0.207	1.246
	Mittel	2.82	0.386	0.221	0.164	1.429
Niere	15	2.23	0.401			
	16	2.23	0.584	0.278	0.306	0.909
	17	2.85	0.422	0.183	0.239	0.741
	Mittel	2.44	0.469	0.231	0.273	0.825

Körpergewicht

Nr.	Versuchsdauer. (Tage)	Körpergewicht (g)		
		Vor. d. Exp.	Nach d. Exp.	Zu- u. Abnahme
15	12	2480	2600	+120
16	13	2630	2580	- 50
17	13	2720	2570	- 50

des Depotfettes begünstigt. Auch die unverseifbaren Substanzen nehmen an Menge zu, und zwar die unbekannten in höherem Grade; also wird $\frac{\text{Cholesterin}}{\text{unbek. Subst.}}$ kleiner.

Leber: Die Fettsäure neigt zu einer Vermehrung. Ebenso verhalten sich die unverseifbaren Substanzen.

Niere: Die Fettsäure scheint etwas vermehrt; die unverseifbaren Substanzen zeigen an Menge fast keine Veränderung.

Die obigen Resultate zeigen zusammengefasst, dass bei der Injektion von Adrenalin die Fettsäure und die unverseifbaren Substanzen in Leber und Niere an Menge fast nicht verändert werden, dass aber im Muskel die beiden Substanzen, und besonders die unbekannten Substanzen, vermehrt sind. Also wirkt das Adrenalin auf Fett und unbekannte Substanzen in den Muskeln vermehrend. Die Versuche von Morita ergaben, da sie an hungernden Kaninchen angestellt wurden, eine Verminderung von Fettsäure und Cholesterin, die meinigen aber, da die Tiere, wie oben erwähnt, normal gefüttert wurden, eine Vermehrung der beiden Substanzen.

VI. Mit Insulin injizierte Kaninchen, I.

Nach Roger und Binet (1926) soll die lipodiätische Fähigkeit der Lunge von der Pankreastätigkeit abhängig sein; denn bei pankreaslosen Tieren fehlt diese Fähigkeit. Lombroso (1924) nimmt an, dass die lipodiätische Fähigkeit der Leber auch bei pankreaslosen Hunden, wenn diese mit Insulin behandelt

worden sind, nicht abweichend von der Norm ist, und dass das Pankreas ein Hormon sezerniert, das den Fettstoffwechsel reguliert. Diese Annahme von Lombroso hat Sunzeri (1924) weiter bestätigt. Dieser fand nämlich bei pankreaslosen Hunden in der Autolyse des Muskelbleis eine stärkere Abnahme der Fettsäure als bei normalen, aber bei den ersteren Hunden, wenn vorher mit Insulin injiziert, keine Veränderung in der Fähigkeit des Fettabbaues. So steht die Wirkung des Insulins in inniger Beziehung zum Fettstoffwechsel. Deswegen habe ich den Lipoidgehalt bei den einzelnen Geweben bei Injektion von Insulin bestimmt. Um den Einfluss des injizierten Insulins auf Tiere zu untersuchen, muss die Untersuchung mit Injektion einer kleinen Dosis und mit Injektion einer grossen Dosis erfolgen; denn im letzteren Fall verschwindet, wie von vielen Autoren nachgewiesen, das Glykogen in der Leber, während es im ersteren Fall vermehrt wird, wie es Frank, Hartmann und Nothmann (1924) festgestellt haben. Daher habe ich zwei Versuchsreihen angelegt, von denen zunächst die mit der kleinen Injektionsdosis beschrieben werden soll.

In den Versuchen wurde in erwähnter Weise normal gefütterten Kaninchen $\frac{1}{3}$ Einheit Insulin (Lillie) pro Kilogramm Körpergewicht täglich subkutan injiziert. Die Resultate zeigt folgende Tabelle:

Muskel: Die Fettsäure ist deutlich vermehrt. Die Vermehrung der Fettmenge im Muskel bei der Injektion des Insulins wurde von Nakamura (1926) und Nagasue (1926) bewiesen.

Die unverseifbaren Substanzen: Ungeachtet der vermehrten Fettsäure weisen die unverseifbaren Substanzen eine Neigung zur Abnahme auf. Dieselben, nach Cholesterin und unbekannten Substanzen getrennt gemessen, zeigen, dass nur das erstere dazu neigt sich etwas zu vermehren, dass aber die letzteren bedeutend vermindert sind, also Cholesterin/unbekannte Substanzen vergrößert ist.

Leber: Die Fettsäure ist fast unverändert. In der Literatur zeigt sie nach Nagasue in der Leber von mit Insulin injizierten

TABELLE VI.

	Kanin- chen Nr	Fettsäure %	Unver- seifbare Subst. %	Choleste- rin %	Unbe- kannte Subst. %	Cholesterin
						Unbekannte Subst
Muskel	21	0.814	0.125	0.048	0.077	0.623
	22	0.858	0.116	0.033	0.083	0.396
	23	0.829	0.132	0.062	0.070	0.886
	Mittel	0.834	0.124	0.048	0.077	0.635
Leber	21	2.38	0.460	0.274	0.186	1.473
	22	2.34	0.424	0.276	0.147	1.810
	23	2.27	0.548	0.263	0.285	0.923
	Mittel	2.33	0.477	0.271	0.206	1.402
Niere	21	2.62				
	22	2.35	0.586	0.311	0.275	1.131
	23	2.66	0.560	0.191	0.368	0.713
	Mittel	2.54	0.573	0.251	0.322	0.922

Körpergewicht.

Nr.	Versuchsdauer. (Tage)	Körpergewicht (g)		
		Vor d. Exp.	Nach d. Exp.	Zu- u. Abnahme
21	29	2650	2670	+ 20
22	30	2430	2570	+140
23	28	2630	2580	- 50

Tieren keine Veränderung, nach Nakamura eine kleine Vermehrung, auf jeden Fall keine grosse Schwankung.

Die unverseifbaren Substanzen sind deutlich vermehrt, was auf die Vermehrung des Cholesterin und der unbekannten Substanzen zurückzuführen ist. Daher kommt es, dass Cholesterin/

unbekannte Substanzen unverändert bleibt.

Niere: Die Fettsäure hat nur die Neigung etwas zuzunehmen. Die unverseifbaren Substanzen zeigen eine mässige Vermehrung, welche an Cholesterin und unbekannten Substanzen zu erkennen ist.

Aus der Zusammenfassung der obigen Resultate geht hervor, dass die tägliche Injektion einer kleinen Dosis Insulin die Fettsäure in den Organen, wie Leber und Niere, an Menge nicht bedeutend verändert, sie aber in den Muskeln auffallend vermehrt; ferner dass die letztere Fettsäure von der ersteren dadurch unterschieden ist, dass sie sich als Depotfett in grosser Menge findet; dieser Unterschied ist aus dem Umstand deutlich zu erkennen, dass in den erwähnten Hungerversuchen die Organfette nur in geringem, die Muskelfette aber in hohem Grade vermindert waren. Viele Autoren behaupten, dass die Körpergewichtssteigerung durch die neuerdings empfohlene Mastkur mit Insulin auf der Appetitsteigerung und der vermehrten Nahrungsaufnahme beruhe; da aber in meinen Versuchen die Nahrung auf eine bestimmte Menge beschränkt war, beruht die Vermehrung des Depotfettes nicht auf der vermehrten Nahrungsaufnahme. Wie ist nun die Zunahme dieser Fette zu erklären? Nach Geelmuyden (1923) soll nach Verabreichung von Insulin der respiratorische Quotient steigen, und dies von der Neubildung der Fette aus Kohlenhydraten herrühren. Auch Lublin (1926) nimmt das erstere an und schliesst daraus, dass das Insulin die Fähigkeit hat, die Fettbildung aus Kohlenhydrat zu befördern. Die von Staub (1927) vorgenommene Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen, welche die Autoren bisher über den Gaswechsel nach der Insulininjektion angestellt haben, ergibt, dass die Insulinwirkung in leichtem Grade eine Steigerung des respiratorischen Quotienten hervorruft. Wenn man von vorstehenden Tatsachen aus die Vermehrung der Muskelfetts in meinen Versuchen betrachtet, so lässt sich vermuten, dass die Fettbildung aus Kohlenhydrat durch Insulin herbeigeführt worden ist.

Von den unverseifbaren Substanzen ist das Cholesterin in jedem Gewebe etwas vermehrt. Die unbekannten Substanzen zeigen in den Organen, wie Leber und Niere, eine Vermehrung, aber in den Muskeln eine Verminderung. Es ist eine merkwürdige Tatsache, dass in den Muskeln Fettsäure und Cholesterin vermehrt, die unbekannten Substanzen aber vermindert sind.

VII. *Insulininjizierte Kaninchen II.*

Wie schon erwähnt, ergibt die Injektion von Insulin, je nach der Dosis, ein verschiedenes Resultat. Deshalb habe ich weitere Versuche vorgenommen, um zu wissen, wie bei mit einer grossen Dosis Insulin injizierten Kaninchen der Lipoidgehalt der einzelnen Gewebe schwankt.

Diese Versuche erfolgten auf dieselbe Weise wie die schon beschriebenen, nur dass die Menge des injizierten Insulins auf 1,5 Einheiten pro Kilo Körpergewicht vermehrt wurde. In allen Fällen traten Krämpfe auf. Ich liess die Tiere 5 Stunden nach der Injektion an Luftembolie zugrunde gehen und analysierte dieselben.

Die Resultate sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Muskel: Die Fettsäure ist bedeutend vermindert. Dass sie in den vorigen Versuchen vermehrt war, aber in diesen vermindert ist, ist eine interessante Tatsache.

Die unverseifbaren Substanzen, vor allem die unbekannten, sind stark vermindert.

Leber: Die Fettsäure neigt dazu, sich etwas zu vermindern, aber nicht bedeutend; die unverseifbaren Substanzen dazu, ein wenig zuzunehmen; dabei strebt das Cholesterin danach, etwas reicher zu werden; aber die unbekannten Substanzen sind unverändert.

Niere: Die Fettsäure hat die Neigung zu einer Vermehrung. Die unverseifbaren Substanzen, Cholesterin und unbekannte Subst. sind beide unverändert.

Wenn man die obigen Resultate zusammenfasst, so findet

TABELLE VII.

	Kanin- chen Nr	Fettsäure %	Unver- seifbare Subst. %	Choleste- rin %	Unbe- kannte Subst. %	Cholesterin
						Unbekannte Subst
Muskel	31 } 32 }	0.583	0.086	0.033	0.053	0.623
	33 } 34 }	0.638	0.090	0.027	0.062	0.435
	Mittel	0.611	0.088	0.030	0.058	0.529
Leber	31	1.74	0.248	0.143	0.105	1.362
	32	2.02	0.390	0.230	0.161	1.422
	34	2.36	0.444	0.261	0.183	1.431
	Mittel	2.04	0.361	0.211	0.150	1.405
Niere	31	3.04	0.472	0.128	0.344	0.372
	32	3.00	0.474	0.218	0.255	0.855
	34	2.27	0.511	0.340	0.170	2.000
	Mittel	2.77	0.486	0.229	0.256	1.076

Körpergewicht

Nr.	Körpergewicht (g)	Symptome n. Injektion
31	2480	Krampf.
32	2550	Dyspnol. Krampf.
33	2320	Dyspnoe.
34	2320	Krampf.

man, dass die Fettsäure in den Organen, wie Leber und Niere, wenig schwankt, aber die in den Muskeln eine starke Verminderung zeigt. Diese Verminderung bedeutet eine Verminderung der Depotfettsäure, da die Muskelfettsäure als Depotfettsäure in grossen Mengen vorhanden ist; sie erfolgt nur binnen 5 Stunden. Die Ursache der so plötzlichen Verminderung des Depotfettes ist wohl darin zu

suchen, dass, da die Injektion einer grossen Dosis von Insulin das Kohlenhydrat im Organismus zur Verminderung bringt, zum Ersatz dafür eine Zuckerbildung aus Fett vor sich geht. Nach Wertheimer (1926) soll bei der Injektion von Insulin die Fettinfiltration in der Leber verschwinden, was er auf die Umwandlung der Fette in Kohlenhydrate zurückführt. Staub (1927) hat die Ergebnisse der bisher von den Autoren über den Gaswechsel nach der Insulininjektion angestellten Untersuchungen zusammengestellt und schliesst daraus, dass die starke Insulinwirkung, bevor hypoglykämische Krämpfe auftreten, der O_2 -Verbrauch und die CO_2 -Produktion steigert und zwar den ersteren in höherem Masse, sodass eine Erniedrigung des resp. Quotienten eintritt. Aus dieser Erniedrigung und der in meinen Versuchen gefundenen Verminderung der Muskelfette kann man die Umwandlung des Muskelfettes in Zucker annehmen. Dass im Organismus der Zucker aus Fett gebildet wird, findet jetzt allgemeine Anerkennung, aber der Beweis dafür ist noch nicht gegeben. In dieser Richtung bieten meine Versuchsergebnisse grosses Interesse.

Die obigen Versuchsergebnisse mit Insulininjektion lassen erkennen, dass eine solche in kleinen Dosen eine Vermehrung des Depotfettes, aber eine solche in grossen Gaben eine Verminderung desselben hervorruft. Wenn man die erstere Erscheinung als Umwandlung von Zucker in Fett, die letztere als solche von Fett in Zucker auffasst, so kann man von dem Insulin sagen, dass es bei dem gegenseitigen Übergang der beiden Substanzen eine wichtige Rolle spielt.

Die unverseifbaren Subst. sind an Menge in Leber und Niere nicht verändert, aber in den Muskeln vermindert, und zwar die unbekannten Substanzen erheblich verringert, bei grossen Insulingaben sogar im höchsten Grade.

Die Verminderung der unverseifbaren Subst. findet sich sowohl bei Insulininjektion, wie auch beim Hungerversuch.

Da bei dem Kohlenhydratmangel in den Geweben, den die Insulininjektion und der Hunger herbeiführen, die unbekannten

Substanzen vermindert werden, erkennt man, dass sie in inniger Beziehung zu dem Kohlenhydratstoffwechsel stehen.

Wie oben erwähnt, verringert sich bei Kaninchen, denen Insulin in grossen Dosen injiziert wurde, die Fettsäure in den Muskeln. Da aber nach dieser Injektion der Wassergehalt der Gewebe erhöht wird, entstehen Zweifel, ob nicht dies vielleicht jene Verminderung herbeiführe. Deswegen habe ich bei diesen Versuchen den Wassergehalt des Muskels betimmt.

Die Resultate zeigt die folgende Tabelle.

TABELLE. VIII.
Normale Kaninchen

Nr.	Gewicht d. Muskels	Gewicht d. trock. Subst.	Wassergehalt %
62	1.6692 g.	0.4164 g.	75.63
63	1.2094 g.	0.2960 g.	75.49
Mittel	1.4393 g.	0.3562 g.	75.27

Insulin-Kaninchen

Nr.	Gewicht d. Muskels	Gewicht d. trock. Subst.	Wassergehalt %
64	1.5535 g.	0.3794 g.	75.63
65	1.5938 g.	0.3814 g.	75.90
Mittel	1.5737 g.	0.3804 g.	75.77

(Insulin-Dosis, 1.5 Einheit pro kg Körpergew.)

Nach der obigen Tabelle wird durch die Injektion einer grossen Dosis Insulin der Wassergehalt des Muskels gesteigert, aber die Verminderung der Fettsäure beruht nicht hierauf.

VIII. Mit Schilddrüsenpräparat gefütterte Kaninchen.

Über die Verminderung des Ätherextraktteils der Gewebe bei mit Schilddrüsen gefütterten Tieren hat Omura (1929) berichtet.

Deswegen habe ich den Lipoidgehalt der Gewebe bei mit diesem Präparat gefütterten Kaninchen bestimmt.

In den Versuchen wurden normal gefütterten Kaninchen vom Schilddrüsenpräparat Thyroideum siccum (Parke, Davis u. Co.) 0,2 g täglich gegeben. Die Resultate zeigt die folgende Tabelle.

TABELLE IX.

	Kanin- chen Nr	Fettsäure %	Unver- seifbare Subst. %	Choleste- rin %	Unbe- kannte Subst. %	Cholesterin
						Unbekannte Subst
Muskel	41	0.709	0.119	0.043	0.077	0.558
	42	0.686	0.172	0.071	0.101	0.703
	43	0.633	0.156	0.031	0.126	0.246
	Mittel	0.676	0.149	0.048	0.101	0.502
Leber	41	2.71	0.328	0.149	0.178	0.837
	42	2.08	0.398	0.237	0.161	1.472
	43	2.18	0.445	0.241	0.204	1.181
	Mittel	2.32	2.390	0.209	0.181	1.163
Niere	41	1.73	0.424	0.193	0.231	0.836
	42	2.07	0.546	0.243	0.303	0.802
	43	2.03	0.435	0.263	0.172	1.529
	Mittel	1.94	0.468	0.233	0.235	1.056

Körpergewicht

Nr.	Versuchsdauer (Tage)	Körpergewicht (g)		
		Vor d. Exp.	Nach d. Exp.	Ab- u. Zunahme
41	20	3240	2070	-1170
42	18	3050	1870	-1180
43	15	2830	1630	-1200

Muskel: Die Fettsäure ist bedeutend vermindert, aber die unverseifbaren Subst. sind nicht verringert, neigen vielmehr dazu, ein wenig zuzunehmen. Das Cholesterin und die unbekannten Substanzen haben beide die Neigung zur Vermehrung, also ist Cholesterin/unbekannten Subst. unverändert.

Aus den vorerwähnten Hunger- und Insulin-Versuchen sah man, dass mit der Fettsäure eine Verminderung der unbekannten Substanzen parallel zustande kommt, aber diese findet sich niemals bei den Schilddrüsen-Versuchen. Diese Tatsache ist wohl darauf zurückzuführen, dass die Fütterung von Schilddrüsenpräparat auf den Stoffwechsel anders wirkt als der Hunger, sowie die Insulin-injektion. Das Kohlenhydrat in den Muskeln wird bei den letzteren beiden Versuchen stark, aber bei dem ersteren nur unbedeutend angegriffen, was auch aus den neuesten Versuchsergebnissen von Murao (1930) erhellt, nämlich, dass das Muskelglykogen nach dem Geben von Schilddrüsen an Menge nicht verändert ist. Also erfolgt die Verminderung der unbekannten Subst. nur bei einem heftigen Angriff auf die Kohlenhydrate in den Muskeln.

Leber: Die Fettsäure ist fast unverändert, das Cholesterin geneigt, sich zu vermehren, aber nicht bedeutend; die unbekannten Subst. verhalten sich so wie das letztere.

Niere: Die Fettsäure und die unverseifbaren Subst. sind keinen grossen Schwankungen unterworfen.

Die Zusammenfassung der obigen Resultate ergibt, dass bei der Fütterung mit dem Schilddrüsenpräparat die Fettsäure und die unverseifbaren Subst. in den Organen, wie Leber und Niere, keine grosse Schwankung, aber in den Muskeln die Fettsäure eine starke Verminderung, die unverseifbaren Subst., d. i. das Cholesterin und die unbekannten Subst. geringe Schwankung zeigen, und dass sonach die Menge der unbekannten Subst. nicht parallel mit der Verminderung der Fettsäure schwankt.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Menge der Fettsäuren und unverseifbaren Subst. wurde bei normalen Kaninchen in Muskel, Leber und Niere bestimmt.

In der Leber und Niere zeigen Cholesterin und unbekannte unverseifbare Substanzen eine nur wenig verschiedene Menge, aber im Muskel ist die Menge der letzteren grösser als die des ersteren.

2. Bei hungernden Kaninchen sind die Fettsäuren in den Muskeln vermindert; von den unverseifbaren Subst. ist Cholesterin in Leber und Nieren etwas vermehrt; die unbekannten unverseifbaren Subst. dagegen sind in Muskel und Nieren vermindert.

3. Bei mit 5 ccm Olivenöl pro Kilo Körpergewicht injizierten Kaninchen sind die Fettsäuren in den Muskeln vermindert, wohl infolge von Olivenölvergiftung, aber die unverseifbaren Subst., sowohl Cholesterin als auch unbekannte Subst., in allen Geweben vermehrt durch Anwesenheit beider Subst. im Olivenöl.

4. Bei Kaninchen, denen Vitamin A (Biosterin), in Olivenöl gelöst, im Überschuss injiziert wurde, sind ungeachtet eines herabgesetzten Körpergewichts die Fettsäuren in den Muskeln vermehrt. Während bei der Injektion von Olivenöl allein, wie oben erwähnt, eine deutliche Fettabnahme erfolgt, findet sich hier eine Fettzunahme; sonach wirkt das Biosterin auf die Fettablagerung günstig. Das Cholesterin ist in jedem Gewebe, die unbekannten Substanzen auch in den Muskeln vermehrt, was wohl darin begründet ist, dass diese beiden Substanzen im Injektionsmaterial schon enthalten waren.

5. 1 mg Adrenalin wurde täglich injiziert: dann fand man eine Zunahme von Fettsäuren und unbekannten Substanzen in den Muskeln.

6. Insulin wurde täglich mit $\frac{1}{3}$ Einheit pro Kilo Körpergewicht injiziert. Die Fettsäuren in den Muskeln waren dann bedeutend vermehrt. Die Wirkung der neuerdings empfohlenen Mastkur mit Insulin beruht, wie viele Autoren sagen, auf der

Appetitsteigerung und vermehrten Nahrungsaufnahme. Da aber in meinen Versuchen die Nahrungsmenge beschränkt war, beruhte die Zunahme des Depotfettes auf der Vermehrung desselben durch die Wirkung des Insulins. Nach den bisherigen Untersuchungen verschiedener Autoren soll nach dem Geben von Insulin, solange dessen Wirkung leicht, der respiratorische Quotient in die Höhe steigen. Man kann also die Fettzunahme daraus erklären, dass durch Insulin Fett aus Kohlenhydrat gebildet wird.

Von den unverseifbaren Substanzen nimmt Cholesterin in Substanzen in den Muskeln vermindert sind. Es ist merkwürdig, allen Geweben in geringem Grade zu, während die unbekannten dass bei der Vermehrung der Fettsäure und des Cholesterins die unbekannten Substanzen vermindert sind.

7. Die Injektion von 1.5 Einheiten Insulin pro Kilo Körpergewicht erregte bei den Kaninchen Krämpfe und brachte die Fettsäuren in den Muskeln zu einer starken Verminderung. Eine solche erhebliche Abnahme des Depotfettes kommt nur innerhalb der ersten 5 Stunden vor. Nach den Untersuchungen vieler Autoren sinkt bei starker Insulinwirkung der respiratorische Quotient ab. Somit wird die Verminderung des Depotfettes als dadurch hervorgerufen angesehen, dass Fett zum Ersatz für einen sich infolge der Insulinwirkung zeigenden Kohlehydratmangel benutzt worden ist. Heutzutage wird die Zuckerbildung aus Fettsäuren theoretisch allgemein anerkannt, aber noch ist kein sicherer Beweis dafür gegeben. Meine oben erwähnten Versuchsergebnisse können als eine interessante Feststellung zu dieser Frage angesprochen werden.

8. Wie oben erwähnt, bewirkt das Insulin in kleinen Gaben eine Vermehrung, in grossen Gaben eine Verminderung des Depotfettes. Gesetzt nun, dass sich im ersteren Falle Zucker→Fett, im letzteren Zucker←Fett abspielt, so kann man sagen, dass das Insulin eine wichtige Rolle für den gegenseitigen Übergang dieser beiden Substanzen spielt.

9. Bei Kaninchen, denen Insulin in grossen Dosen gegeben

wurde, nahmen in den Muskeln die unbekannten Substanzen erheblich ab, wie sie auch in den schon erwähnten Hungerversuchen vermindert waren; in beiden Fällen entstand in den Muskeln ein Kohlehydratmangel. Daraus ist zu entnehmen, dass die unbekannten Substanzen in enger Beziehung zum Kohlehydratstoffwechsel stehen.

10. Bei der Fütterung mit dem Schilddrüsenpräparat nahm in den Muskeln die Fettsäure bedeutend ab, die unbekannten unverseifbaren Substanzen aber nicht. Bei den Hunger- und Insulinversuchen fand man, dass die Fettsäure und die unbekannten Substanzen zugleich vermindert waren. Aus diesen Tatsachen kann man erkennen, dass die Fütterung von Schilddrüsenpräparat einen anderen Einfluss auf den Stoffwechsel ausübt, als das Hungern und die Insulininjektion. Nach den Angaben der Autoren soll das Muskelglykogen bei Schilddrüsenfütterung nicht vermindert, aber bei Hunger und Insulininjektionen bedeutend herabgesetzt sein. Also muss wohl die Verminderung der unbekannten Substanzen die Folge eines heftigen Angriffs auf das Kohlehydrat in den Muskeln sein.

SCHLUSS.

1. Bei hungernden Kaninchen zeigen die Fettsäuren und unbekannten Substanzen in den Muskeln eine erhebliche Abnahme.

2. Die überschüssige Injektion mit Vitamin A (Biosterin) bringt, ungeachtet eines verminderten Körpergewichts, die Fettsäure in den Muskeln zu starker Vermehrung, was zeigt, dass das Vitamin A (Biosterin) die Depotfettablagerung begünstigt.

3. Die Injektion von Adrenalin ruft in den Muskeln eine Zunahme der Fettsäuren und unbekannten unverseifbaren Substanzen hervor, woraus zu ersehen ist, dass auch das Adrenalin die Vermehrung des Depotfettes fördert.

4. Durch die Injektion von Insulin in kleinen Dosen wird die Fettsäure in den Muskeln beträchtlich vermehrt. Somit beruht die Wirkung der Mastkur mit Insulin auf der Zunahme des Depot-

fettes. Diese Zunahme erklärt sich dadurch, dass durch Insulin Fett aus Zucker gebildet wird.

5. Die Injektion von Insulin in grossen Dosen vermindert die Fettsäure in den Muskeln in hohem Masse, was wohl daher kommt, dass durch die Insulinwirkung plötzlich ein Kohlehydratmangel in den Geweben herbeigeführt, und zum Ersatz dafür das Fett zum Verbrauch gebracht worden ist.

6. Aus den obigen Tatsachen ergibt sich, dass die Injektion von Insulin in kleinen Dosen eine Umwandlung von Zucker in Fett, in grossen Dosen eine solche von Fett in Zucker hervorruft, also spielt das Insulin bei den Umwandlungen von Zucker \rightleftharpoons Fett eine grosse Rolle.

7. Bei der Injektion einer grossen Dosis von Insulin zeigen, wie im Hunger, die unbekannten unverseifbaren Substanzen in den Muskeln eine Verminderung; und daraus, dass man in diesen beiden Fällen einen Angriff auf die Kohlehydrate in den Geweben findet, ist zu ersehen, dass die unbekannten Substanzen in inniger Beziehung zu dem Kohlehydratstoffwechsel stehen.

8. Die Fütterung mit dem Schilddrüsenpräparat vermindert die Menge der Fettsäure in den Muskeln, aber die der unbekannten Substanzen nicht.

Es war schon nachgewiesen, dass bei den Schilddrüsenversuchen die Menge des Muskelglykogens nicht verändert wird, während sie bei dem Hungern, sowie bei der Insulininjektion bedeutend abnimmt. Daraus kann man erkennen, dass ein heftiger Angriff auf das Kohlehydrat in den Muskeln eine Verminderung der unbekannten Substanzen hervorruft.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

Frank, Hartmann u. Nothmann (1924): *Klia. Wochenschr.* Jahrg. 4, 1067.

Geelmuyden (1923): *Ergeb. der Phys.*, **22**, 292.

Igarashi (1928): *Seikwaizasshi (Japanisch)*, **47**, 9.

- Kakiuchi, S. (1909): *Biochem. Z.*, **32**, 137.
Lawaczek, H. (1923): *Z. f. physiol. Chem.*, **125**, 210.
Lombroso (1924): *Arch. intern. de. Physiol.*, **23**, 321.
Lublin (1920): *Arch. f. ex. Path. u. Pham.*, **115**, 101.
Morita, C. (1924): *J. Biochem.*, **4**, 73.
Murao (1930): *Folia endocrinologica Japonica*, **4**, 853.
Nagasue (1926): *Mitteilungen der medizinischen Gesellschaft zu Tokyo*,
40, 1.
Nakamura (1926): *Mitteilungen der medizinischen Gesellschaft zu*
Chiba, **4**, 7.
Omura (1929): *Folia endocrinologica Japonica*, **4**, 2147.
Rogen u. Binet (1926): *Scand Arch. Physiol.*, **49**, 215.
Staub (1927): *Ergeb. inn. Mediz.*, **31**, 121.
Sugata, H. (1929): *Seikwaizasshi (Japanisch)* **48**, 6.
Sunzeri (1924), *Arch. intern. de Physiol.*, **23**, 337.
Wertheimer (1926): *Pfl. Arch.*, **213**, 298.

ON THE CO₂ ABSORPTION VELOCITY OF NaOH- and KOH-SOLUTIONS

By

KIYOSHI MASAKI.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shōjō.)

(Received for publication, December 20, 1930)

INTRODUCTION

One of the most accurate methods of estimating gaseous CO₂ is Nishi's method reported in this journal. The method is a modification of the well-known Pettenkofer method, and consists in the CO₂ being absorbed in a standard alkali solution by bubbling the gas to be estimated through it, and then the solution is titrated with thymolphthalein as the indicator. For this method and similar cases, an alkali solution is wanted which will absorb CO₂ as speedily as possible. For this purpose, the baryta solution is not suitable, as the precipitates of BaCO₃ which form around the bubble hinders further absorption markedly, and thus the NaOH- and KOH-solutions remain for use. Nishi used the NaOH-solution for his method, but, if the KOH-solution absorbs CO₂ more rapidly than the NaOH-solution does, as is widely believed, it will be more convenient to use KOH for his method. For these two alkali solutions, however, no data for the comparison of the CO₂-absorption velocity have been reported, though many studies have been carried out in order to elucidate the mechanism of the absorption process (Mitsukuri, Hatta, etc.).

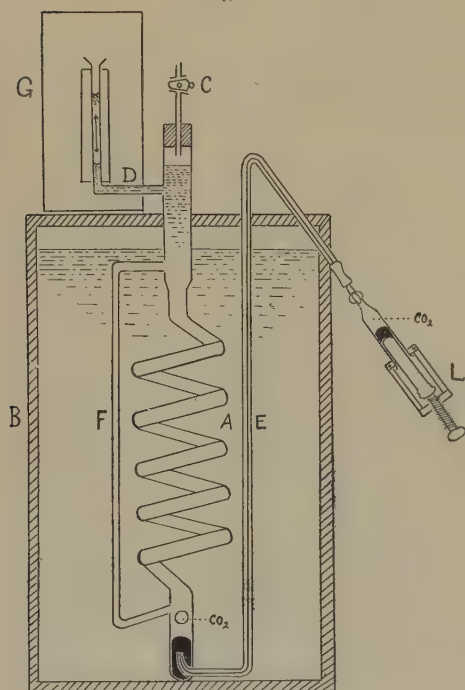
The present study aims at making clear the comparative CO₂-absorption velocities of these two alkali solutions at the usual experimental temperatures.

METHODS

The principle of the measurement is that a bubble of the CO₂

gas is passed into the alkali solution, and the reduction of the gas volume is recorded relating to the lapse of time. The arrangement is sketched in Fig. 1. **A** is a spiral absorption tube of ca. 1.5 m.

Fig. 1.



long and 0.7 cm bore, immersed in a thermostat. The bottom of the tube is served with mercury, through which a single CO_2 bubble is expelled out by means of a gas-tight syringe **L**, which is driven by a screw-adjustment. Above the mercury, the tube is filled with ca. 60 cc. of the alkali solution. The side tube **F** facilitates the circulation of the solution caused by the ascent of the bubble along the main tube. The top of the tube is stoppered where a tap is mounted, which is necessary to drive out the gas-content of the tube.

The absorption tube has a side capillary tube **D** at its upper part. The meniscus of the solution rests on a lower point of the vertical capillary of this side tube. When a CO_2 bubble is forced into the mercury, the meniscus in the vertical capillary ascends a certain height, as is shown in the figure. Now, as soon as the bubble bursts out of the mercury surface into the alkali solution, the absorption begins, and, while the bubble ascends along the tube, its volume is reduced by absorption. This causes a gradual descent of the meniscus in the capillary, which is recorded on a

bromide paper stretched on a rotating kymograph. Illumination is supplied by a light passing through a vertical slit and projected on the capillary. The reflection of the light at the meniscus is strong enough to leave a white line on the moving bromide paper. The time record is taken simultaneously with a tuning fork of 50 vibrations per second.

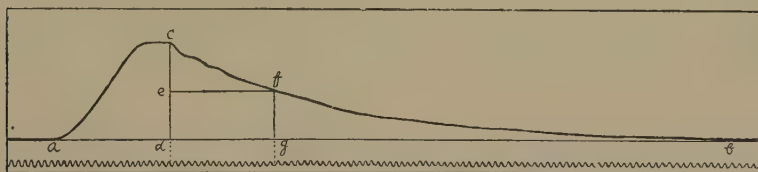


Fig. 2.

Fig. 2 is an example of the reproduction of a trace of the meniscus thus recorded. The height cd corresponds to the volume of a single bubble forced into the mercury. db is the time necessary for the bubble to be absorbed completely, and cd/db will represent the mean velocity of absorption. But, the descent of the curve is very slow at the end period, and the estimation of the time db may include a large error. Therefore, we took the point of absorption of a half of the bubble. ce represents the volume of the half-bubble absorbed, and $ef=dg$ is the time necessary for its absorption, and ce/dg will be taken as a representative of the relative absorption velocity.

The CO_2 gas used for this experiment was generated by pouring H_2SO_4 into a saturated Na_2CO_3 solution, so that no other gases were contained in the bubble. If, however, a minute amount of air becomes intermixed in the bubble, the level of the meniscus after absorption (b) does not come back to the initial level (a). In such a case cd should be taken as the vertical distance of c from the level of b , and not of a , and consequently the half-bubble ce should be half of the vertical distance of c from the b -level.

In order to convert the height of the record into the actual volume, a measured amount of water was forced into the absorp-

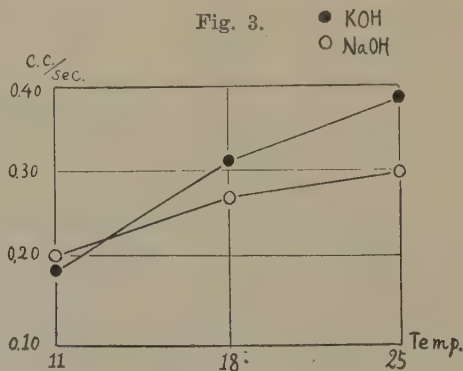
tion tube and the ascent of the meniscus was recorded. It was found that 0.1 cc. corresponds to 1.39 cm in height.

RESULTS

The 1 *N* NaOH- and 1 *N* KOH-solutions were used as the absorption medium. The same experiments were repeated several times, and the mean velocities were calculated, probable errors being also taken into consideration. Results are summarized in the following table.

Temp. (°C)	solution	absorption velocity (cc./sec.)
11°	NaOH	0.202±0.0024 (mean of 7 estimates)
	KOH	0.187±0.0090 (" " 8 ")
18°	NaOH	0.266±0.0047 (" " 11 ")
	KOH	0.312±0.0074 (" " 10 ")
25°	NaOH	0.298±0.0040 (" " 8 ")
	KOH	0.383±0.0161 (" " 4 ")

Here we see that, at 11°, NaOH absorbs CO₂ more rapidly, though slightly so, than KOH, and at 18° and 25°, KOH absorbs more rapidly, and that the difference of the absorption velocity increases with ascending temperatures. This is clearly shown in Fig. 3, which is the graphic representation of the above table. In other words, the CO₂ absorption velocity of the alkali solutions generally increases with ascending temperatures. The rate of this increase with temperature is larger for the KOH-solution, than for the NaOH-solution. At ordinary experimental temperatures, the ratio of the CO₂-absorption velocities is as follows.



	The ratio of CO ₂ absorption velocity of NaOH : KOH
11°	1 : 0.93
18°	1 : 1.17
25°	1 : 1.29

SUMMARY

The CO₂-absorption velocities of each 1 N NaOH- and KOH-solution being compared at 11°C, the ratio is 1:0.93, the absorption of NaOH being the more speedy. At 18°, and 25°, the ratios are 1:1.17, and 1:1.29 respectively, KOH being the more speedy. The rate of increase in the absorption velocity with ascending temperature is larger for KOH than for NaOH.

The author expresses his thanks to Mr. S. Miyake for his assistance in taking the photographic records.

REFERENCES

- Hatta (1929): Journ. Soc. Chem. Industry, Japan (Japanese) **32**, 809.
 Mitsukuri (1927-1928): Journ. Chem. Soc. of Japan (Japanese) **48**,
 53 and 371; do. **49**, 199.
 Nishi (1925): Journ. Biochem. **4**, 473.

Protocol
Absorption of CO₂ in alkali-solutions

adsorption medium	Temp.	No. of exper.	Height of Half-bubble (cm)	cc. for Half-bubble	Nos. of vibration for absorption of half-bubble	sec. for absorption of half-bubble	absorption velocity cc./sec.
1 N NaOH-solution	11°	1	2.00	0.144	39.0	0.780	0.185
		2	2.23	0.160	38.2	0.764	0.209
		3	2.24	0.161	38.0	0.760	0.212
		4	1.94	0.140	34.2	0.684	0.205
		5	2.08	0.150	38.4	0.768	0.195
		6	2.34	0.168	40.2	0.804	0.209
		7	2.02	0.145	36.0	0.720	0.201
		mean					0.202±0.0024
	18°	1	2.69	0.194	34.0	0.680	0.285
		2	2.45	0.176	39.3	0.786	0.223
		3	2.00	0.144	32.0	0.640	0.225
		4	2.16	0.155	27.8	0.556	0.279
		5	2.08	0.150	27.3	0.546	0.275
		6	2.15	0.155	29.0	0.580	0.267
		7	1.85	0.133	26.6	0.532	0.250
		8	2.24	0.161	30.0	0.600	0.268
		9	2.00	0.144	26.5	0.530	0.272
		10	1.87	0.135	23.4	0.468	0.288
		11	2.35	0.169	29.2	0.584	0.289
		mean					0.266±0.0047
	25°	1	2.10	0.151	27.2	0.544	0.278
		2	1.90	0.137	23.2	0.464	0.295
		3	1.80	0.129	22.5	0.450	0.287
		4	2.18	0.157	24.8	0.496	0.317
		5	1.96	0.141	24.3	0.486	0.290
		6	2.14	0.154	25.3	0.506	0.304
		7	2.02	0.145	25.4	0.508	0.285
		8	2.33	0.168	25.8	0.516	0.326
		mean					0.298±0.0040

On the CO₂ absorption velocity of NaOH- and KOH-solutions. 217

Protocoll (Continued)

adsorption medium	Temp.	No. of exper.	Height of Half- bubble (cm)	cc. for Half- bubble	Nos. of vibration for absorp- tion of half- bubble	sec. for absorp- tion of half- bubble	absorption velocity cc./sec.
1 N KOH-solution.	11°	1	1.55	0.112	26.8	0.536	0.209
		2	2.45	0.176	32.5	0.650	0.271
		3	1.84	0.132	36.0	0.720	0.183
		4	1.75	0.126	40.8	0.816	0.154
		5	1.68	0.121	37.9	0.758	0.160
		6	1.81	0.130	36.5	0.750	0.173
		7	1.75	0.126	37.2	0.744	0.169
		8	1.70	0.122	33.8	0.676	0.180
		mean					0.187±0.0090
	18°	1	1.74	0.126	23.0	0.460	0.274
		2	2.26	0.163	24.5	0.490	0.333
		3	1.95	0.140	26.0	0.520	0.269
		4	2.15	0.155	21.0	0.420	0.369
		5	1.87	0.135	20.2	0.404	0.334
		6	1.79	0.129	22.0	0.440	0.293
		7	1.78	0.128	21.2	0.424	0.302
		8	2.64	0.190	27.5	0.550	0.345
		9	1.75	0.126	23.0	0.460	0.274
		10	2.00	0.158	24.0	0.480	0.329
		mean					0.312±0.0074
	25°	1	2.70	0.194	22.7	0.454	0.427
		2	2.68	0.193	23.0	0.460	0.420
		3	2.14	0.154	22.0	0.440	0.350
		4	2.04	0.147	22.0	0.440	0.334
		mean					0.383±0.0161

DIE BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL. X.

Über den Einfluss der Gallensäure und der Phosphate auf die Zuckerassimilation. III

VON

SEI FUZITA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 23. Dezember 1930)

In meinen vorigen Mitteilungen (1930) habe ich schon berichtet, dass im Kaninchenorganismus die per os eingegebenen verschiedenen Zucker in der Reihenfolge: Fruchtzucker, Traubenzucker, Mannose und Galaktose ansteigend im Harn ausgeschieden werden, und dass diese in der Reihe ansteigende Zuckerausscheidung durch die Zufuhr von Cholsäure in derselben Reihenfolge absteigend herabgesetzt wird.

Weiter habe ich bei meinen Versuchen gefunden, dass die Glykogenbildung der Leber aus diesen Zuckerarten durch Zufuhr von Cholsäure auch in derselben Reihenfolge absteigend gefördert wird.

Auf Grund der Befunde habe ich auch hervorgehoben, dass diese die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Gallensäure entweder beruht auf der Verschiebung der Phosphatpufferung in der Leber nach der alkalischen Seite hin, die durch die den Nucleinstoffwechsel und die Nuclease der Leber fördernden Eigenschaften der Gallensäure zu Stande kommt, oder bedingt ist durch die begünstigende Phosphorierung des Zuckers, die bekanntlich für die Glykogenbildung und für den Glykogenabbau im Organismus unbedingt notwendig ist.

Betrachtet man das Ergebnis, dass die Glykogenbildung aus Fruchtzucker bei Zufuhr von Gallensäure unter den verschiedenen

Monosachariden: Fruchtzucker, Traubenzucker, Mannose und Galaktose am stärksten eintritt, so scheinen mir die vermehrten OH-Ionen unter Vermehrung der sekundären Phosphate in der Leber für diese stärkste Glykogenbildung aus Fruchtzucker eine grosse Rolle zu spielen, wenn der Polymerisation der verschiedenen Zucker in der Leber eine Umwandlung derselben in eine gemeinsame Reaktionsform in Gestalt der enolisierten Glukose vorausgehen müsste, wie Isaac (1914) angenommen hat.

Der Befund von Königsfeld (1909), dass der Traubenzucker erst nach der Ausscheidung durch die Niere bei alkalischer Reaktion des Harns bei längerem Stehen in Laevulose übergeführt wird, und der Befund von Isaac (1914), dass die leicht enolisierbare Fruktose leichter als der Traubenzucker in Glykogen übergeht, die es auch bei mir der Fall war, sprechen für die Ansicht, dass wie Verschiebung der Phosphatpufferung nach der alkalischen Seite hin dem Glykogenbildungsprozess vorausgeht, indem dadurch eine Umwandlung der verschiedenen Zucker in einen gemeinsamen reaktionsfähigen Zucker stattfindet.

Schon Fuziwara (1930) hat gefunden, dass die Zufuhr von Gallensäure eine vermehrte Ausscheidung der sekundären Phosphate im Harn herbeiführt, und nach der Angabe von Kawada soll die Ausscheidung des Calciums und der Phosphorsäure in der Lebergalle durch die Zufuhr von Cholsäure gesteigert werden.

Nach den Daten scheinen mir die sekundären Phosphate bei der Glykogenbildung der Leber eine grosse Rolle zu spielen.

In diesem Sinne habe ich den Einfluss der Gallensäure auf die Glykogenbildung der Leber mit oder ohne sekundäre Phosphate untersucht.

Schon im Jahre 1905 haben Harden und Young festgestellt, dass eine Zugabe von phosphorsaurem Salz die alkoholische Gärung des Zuckers durch Hefe um ein Vielfaches beschleunigt. In Verfolg dieser Beobachtung wurde erkannt, dass unter der Einwirkung eines Teilfermentes der Gärung eine Veresterung des in der hypothetischen Enolform vorhandenen Zuckers einsetzt. Dieser

Diphosphorsäureester ist nach Young (1912) allen drei gärenden Hexosen gemeinsam.

Neuerdings wurden auch Hexosemonophosphorsäuren von Robison (1922) bei der Gärung beobachtet.

Andrerseits haben Embden und seine Mitarbeiter (1914, 1921) im Muskelpresssaft eine Zucker-Phosphorsäure-Verbindung gefunden, aus welcher die Milchsäure gebildet wird, und die von ihnen Laktacidogen genannt wurde.

Nach neueren Untersuchungen von Embden und Zimmermann (1927) ist das Laktacidogen als ein Monophosphorsäureester der Hexose anzusprechen, und nach ihnen ist der Diphosphorsäureester eine Stabilisierungsform. Inwieweit beim Abbau und Aufbau des Kohlehydrats in der Leber die Phosphorsäure notwendig ist, ist noch ganz unklar. Für die Leber steht aber fest, dass sie den Zucker nur dann weiter verwerten kann, wenn er zuerst zu Glykogen aufgebaut wurde.

In diesem Sinne ist es von Bedeutung, den Einfluss der sekundären Phosphate und der Gallensäure auf die Glykogenbildung in der Leber zu erforschen, von denen die letztere den Nucleinstoffwechsel fördert und die Phosphorsäure in Harn und Galle vermehrt, wie Karasawa (1926/27), Hatakeyama (1927/28), Okamura (1928) und Kawada (1930) in ihren Experimenten bewiesen haben.

EXPERIMENTELLER TEIL

Zum Versuch wurden kräftige männliche Kaninchen verwendet, die einige Wochen lang mit folgender bestimmter Nahrung gefüttert worden waren: Okara 50 g, Gemüse 50 g, Wasser 100 ccm.

Die Kaninchen wurden zuerst 4 Tage lang in Hunger gehalten, damit der Glykogengehalt der Leber ungefähr frei werden konnte. Dann wurden die verschiedenen Zuckerarten wie *d*-Glukose, *d*-Fruktose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose in 3 g und sekundäres Natriumphosphat in 0.5 g pro kg Körpergewicht als 5%ige Lösung ohne und mit 0.3 g Cholat pro kg Körpergewicht zusammen in 50 ccm

Wasser gelöst per os mittelst der Schlundsonde an die Kaninchen verfüttert.

Nach 3 Stunden wurden die Kaninchen unter Verblutung getötet. Die schnell herausgeholte Leber wurde zuerst abgewogen, und dann ihr Glykogengehalt nach der in der vorigen Mitteilung (1930) angegebenen Methode bestimmt.

Zur Kontrolle wurde der Einfluss, den die peroral eingeführten Phosphate von verschiedenen Mengenverhältnissen mit oder ohne Cholat auf die Glykogenbildung aus Glukose haben, beobachtet. Dabei wurde das sekundäre Natriumphosphat 0.1–0.25–0.35 g mit oder ohne 0.3 g Cholat pro kg Körpergewicht per os verabreicht, und der Glykogengehalt der Leber unter genau den gleichen Bedingungen und nach der gleichen Methode bestimmt.

Um das Ergebnis leicht verständlich zu machen, habe ich den durchschnittlichen Wert des Glykogengehaltes der Leber in allen Versuchsreihen des Zuckers in Tabelle V angegeben und mit dem Wert des Glykogengehaltes aus den vorigen Versuchen verglichen, der in den oberen Reihen A der Tabelle V angeführt ist.

Die Resultate sind aus den folgenden Tabellen I–VIII ersichtlich.

I. Glykogenbildung aus Fruktose.

Aus den Versuchen A und B der Tabelle I und V(A) zeigt sich, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Fruchtzucker mit sekundärem Natriumphosphat (0.5 g pro kg Körpergewicht) durchschnittlich mit 3.402% angegeben wird, und der Durchschnittswert des Leberglykogens bei Zufuhr des Fruchtzuckers allein 2.748% beträgt.

Also wird die Glykogenbildung aus Fruchtzucker durch die Zufuhr des sekundären Natriumphosphates gefördert. Aber der durchschnittliche Wert des Leberglykogens bei Zufuhr von Cholsäure mit Fruchtzucker beträgt 4.178% und ist viel höher als der bei Zufuhr des sekundären Natriumphosphates mit Fruchtzucker.

Aus den Daten geht hervor, dass das sekundäre Natriumphos-

phat bei der Glykogenbildung aus Fruktose durch die Cholsäure nicht vertreten wird.

Der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat und Cholsäure mit Fruchtzucker wird durchschnittlich mit 4.551% angezeigt, wie aus dem Versuch B der Tabelle I ersichtlich ist. Aus den obigen Befunden ersieht man, dass die Glykogenbildung aus Fruchtzucker durch die Zufuhr des

TABELLE I. (Laevulose)

(A)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
17/Jul.	2620	2330	54	4.150	Laevulose 3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
"	2570	2340	47	3.213	
18	2340	2060	38	3.813	
"	1940	1600	33	3.025	
"	2320	2000	40	2.825	
"	1820	1510	34	3.263	
23	2250	1970	36	2.763	
"	2620	2370	48	3.413	
"	1880	1550	36	3.813	
"	2230	1960	38	3.738	

Durchschnittswert 3.402

(B)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
19/Jul.	2320	1900	43	4.825	Laevulose 3 g Cholsäure 0.3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
"	2500	2100	46	4.900	
"	1970	1660	42	4.078	
"	2240	1960	40	5.313	
"	1910	1550	37	4.213	
22	2260	1900	39	4.150	
"	2190	1930	36	4.700	
"	1890	1590	35	4.213	
"	1970	1690	39	4.425	
"	1890	1580	35	4.287	

Durchschnittswert 4.511

sekundären Natriumphosphates gefördert und durch weiteren Zusatz von Cholsäure noch mehr gesteigert wird.

Auf Grund der Daten kommt man zu dem Schluss, dass das sekundäre Natriumphosphat bei der Glykogenbildung der Leber aus Fruchtzucker eine bedeutende Rolle spielen muss.

II. Glykogenbildung aus Glukose.

Aus den Tabellen II(AB) und V(A) sieht man, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat (0.5 g pro kg Körpergewicht) durchschnittlich mit 1.835%, der bei Zufuhr des Traubenzuckers allein durchschnittlich mit 1.891% angegeben wird. Hier bleibt also die Glykogenbildung aus Traubenzucker durch die Zufuhr des sekundären Natriumphosphates fast unbeeinflusst oder wird dadurch vielmehr herabgesetzt. Der durchschnittliche Wert des Leberglykogens beträgt bei Zufuhr von Cholsäure 2.831% und ist viel höher als der bei Zufuhr des sekundären Natriumphosphates. (Siehe Tabelle V(A) und II(AB).

Der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat und Cholsäure wird durchschnittlich mit 1.733% angegeben, wie der Versuch B der Tabelle II zeigt.

TABELLE II. (Glukose)
(A)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
24/Jul.	2350	1980	52	1.863	Glukose 3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
"	2280	1900	37	1.800	
"	2200	1840	38	1.600	
"	2050	1750	37	1.988	
26	1980	1540	38	1.663	
"	2110	1760	36	2.113	
"	1950	1530	33	1.863	
3/Aug.	1830	1500	34	1.860	
"	1980	1620	38	1.725	
"	1930	1650	34	1.877	
Durchschnittswert				1.835	

(B)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
25/Jul.	2250	1910	44	1.413	Glukose 3 g
„	2060	1640	39	1.887	Cholsäure 0.3 g
„	1910	1510	34	1.550	Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
27	1940	1600	32	1.475	
„	1890	1550	31	1.988	
„	1980	1630	35	1.663	
28	1900	1650	34	1.725	
„	2130	1830	38	1.975	
„	1990	1730	36	1.863	
3/Aug.	1930	1630	36	1.988	
Durchschnittswert				1.733	

Die die Glykogenbildung aus Glukose fördernde Wirkung der Cholsäure wird also durch die Mitzufuhr des sekundären Natriumphosphates sehr deutlich herabgesetzt, wenn die Menge des eingeführten sekundären Natriumphosphates 0.5 g pro kg Körpergewicht beträgt. Diese Herabsetzung der die Glykogenbildung fördernden Wirkung der Cholsäure scheint mir darauf zu beruhen, dass die Menge des mit der Cholsäure zugeführten sekundären Natriumphosphates zu gross gewesen ist.

III. Glykogenbildung aus Mannose.

Die Tabellen III(AB) und V(A) zeigen, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat (0.5 g pro kg Körpergewicht) durchschnittlich 1.673% und bei Zufuhr der Mannose allein 1.809% beträgt.

Bei Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat und Cholsäure wird er durchschnittlich mit 1.582% und bei Zufuhr der Cholsäure allein mit 2.641% angegeben. (Siehe Tabelle III(AB) und V(A).)

Aus diesen Daten ergibt sich, dass die Glykogenbildung aus Mannose in der Leber durch die Zufuhr des sekundären Natriumphosphates viel mehr herabgesetzt wird, als es bei Glukose der Fall war. Die die Glykogenbildung fördernde Wirkung der Cholsäure

wird durch die Mitzufuhr des sekundären Natriumphosphates nicht nur aufgehoben, sondern vielmehr herabgesetzt, wenn eine genügende Menge sekundären Natriumphosphates (0.5 g pro kg Körpergewicht) verabreicht wird.

TABELLE III. (Mannose)

(A)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
29/Jul.	2620	2270	41	1.988	Mannose 3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
"	1920	1500	29	1.663	
"	2770	2400	44	1.600	
30	1800	1520	32	1.538	
"	1940	1660	38	1.413	
"	2050	1590	31	1.863	
9/Aug.	1980	1660	30	1.725	
"	2130	1880	37	1.413	
"	2010	1670	37	1.663	
"	1960	1640	34	1.863	

Durchschnittswert 1.673

(B)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
3/Aug.	2030	1720	32	1.877	Mannose 3 g Cholsäure 0.3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
"	1830	1500	31	1.313	
"	1850	1600	34	1.475	
5	1880	1550	33	1.863	
"	2090	1770	36	1.663	
"	2320	1900	35	1.350	
"	2180	1800	39	1.413	
8	1970	1650	32	1.725	
"	2070	1740	33	1.663	
"	1900	1640	31	1.475	

Durchschnittswert 1.582

Diese Herabsetzung der Glykogenbildung bei Zufuhr des sekundären Natriumphosphates scheint mir auch auf einer zu reichlichen Zufuhr desselben mit Cholsäure zu beruhen, wie es auch bei der Glykogenbildung aus Glukose der Fall war.

IV. *Glykogenbildung aus Galaktose.*

Aus den Tabellen IV(AB) und V(A) ist ersichtlich, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat (0.5 g pro kg Körpergewicht) durchschnittlich mit 1.473% und der bei Zufuhr der Galaktose allein mit 1.545% gezeigt wird. Er wird bei Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat und Cholsäure durchschnittlich mit 1.329% und bei der von Cholsäure allein mit 2.193% angegeben. Die Daten zeigen, dass die Glykogenbildung aus Galaktose in der Leber durch Zufuhr des sekundären Natriumphosphates genau wie die aus Mannose und Glukose vielmehr herabgesetzt wird. Die die Glykogenbildung fördernde Wirkung der Cholsäure wird also durch die Mitzufuhr des sekundären Natriumphosphates nicht nur aufgehoben, sondern vielmehr herabgesetzt, wie es auch bei Glukose und Mannose der Fall war. Aus den oben genannten Daten geht hervor, dass bei Prüfung des Einflusses von sekundärem Natriumphosphat und Cholsäure auf die Glykogenbildung der Leber aus verschiedenen Zuckerarten wie Fruktose, Glukose, Mannose und Galaktose gefunden wurde, dass die Glykogenbildung aus Fruchtzucker in der Leber durch Zufuhr des sekundären Natriumphosphates gefördert, und durch weitere Zufuhr von Cholsäure aufs neue gesteigert wird, während im Gegensatz dazu die Glykogenbildung aus Glukose, Mannose und Galaktose dadurch nicht nur nicht gefördert, sondern vielmehr herabgesetzt wird, und die Wirkung der Cholsäure, welche die Glykogenbildung aus diesen Zuckern fördert, durch Zufuhr des sekundären Natriumphosphates herabgesetzt wird, wenn das sekundäre Natriumphosphat in 0.5 g pro kg Körpergewicht unter sonst genau den gleichen Bedingungen wie Zucker mit oder ohne Cholsäure an die Kaninchen per os verfüttert wird.

Es ist sehr wohl möglich, dass die durch die Zufuhr des sekundären Natriumphosphates bedingte Herabsetzung der die Glykogenbildung fördernden Eigenschaften der Cholsäure von den Mengenverhältnissen des zugeführten sekundären Natriumphos-

TABELLE IV. (Galaktose)

(A)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
10/Aug.	1850	1580	38	1.475	Galaktose 3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
„	1870	1550	33	1.363	
11	1920	1570	30	1.288	
„	2450	2100	40	1.350	
„	2350	1950	42	1.413	
„	2090	1700	38	1.600	
13	2050	1800	37	1.313	
„	2130	1800	39	1.538	
„	2320	2000	40	1.725	
„	2250	1950	44	1.663	

Durchschnittswert 1.473

(B)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
10/Aug.	1850	1540	36	1.288	Galaktose 3 g Cholsäure 0.3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
„	1940	1650	33	1.145	
12	2580	2220	44	1.979	
„	2060	1740	36	1.475	
„	1950	1590	33	1.600	
14	2320	2000	40	1.313	
„	2550	2220	44	1.350	
„	2030	1740	32	1.475	
18	2050	1590	33	1.125	
„	2280	2000	40	1.538	

Durchschnittswert 1.329

phates abhängig ist. In diesem Sinne habe ich unter Zufuhr von verschiedenen Mengen sekundären Natriumphosphates sowohl mit als auch ohne Cholsäure die Glykogenbildung aus Glukose verfolgt.

V. Glykogenbildung aus Glukose unter Zufuhr von verschiedenen Mengen sekundären Natriumphosphates sowohl mit als auch ohne Zufuhr von Cholsäure.

Bei diesem Versuch wurde das sekundäre Natriumphosphat in 0.1–0.35 g pro kg Körpergewicht sowohl mit als auch ohne Zufuhr von Cholsäure den Kaninchen per os verabreicht, und der Glykogengehalt der Leber untersucht.

Die durchschnittlichen Werte aller Versuche wurden in Tabelle V(BC) zusammengestellt. Die einzelnen Versuchsergebnisse sind in den Tabellen VI–VIII angegeben.

Aus den Tabellen V(BC) und VI–VIII ergibt sich, dass die Glykogenbildung der Leber aus Glukose durch Zufuhr von 0.1–0.25 g sekundärem Natriumphosphat gesteigert, dagegen durch die von 0.35 g schon herabgesetzt wird. Durch Zufuhr von 0.5 g wird sie noch mehr herabgesetzt, sodass der Glykogenwert bei Zufuhr von 0.5 g sekundärem Natriumphosphat viel niedriger ist als der bei Zufuhr des Traubenzuckers allein. In sämtlichen Fällen ist der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr des sekundären Natriumphosphates viel niedriger als der bei Zufuhr der Cholsäure allein. Bei Zufuhr von Cholsäure wird der Glykogengehalt der Leber durch Zufuhr von 0.1 g sekundärem Natriumphosphat deutlich gesteigert, und zwar beträgt der durchschnittliche Wert des Glykogengehaltes der Leber 2.936%, der Wert bei Zufuhr der Cholsäure allein 2.831%. Der Glykogengehalt bei Zufuhr von Cholsäure mit 0.1 g sekundärem Natriumphosphat ist also viel höher als der bei Zufuhr der Cholsäure allein. Dagegen wird die Glykogenbildung der Leber aus Glukose bei Zufuhr von Cholsäure mit 0.25–0.5 g sekundärem Natriumphosphat herabgesetzt.

Diese Herabsetzung schreitet vor, je mehr die Menge der zugeführten sekundären Natriumphosphate steigt, bis endlich der

Glykogenwert der Leber bei Zufuhr einer reichlichen Menge sekundären Natriumphosphates weit hinter dem bei Zufuhr des Zuckers allein zurücksteht. (Siehe Tabelle V(C)).

Aus der Tabelle V(BC) zeigt sich, dass die Glykogenbildung der Leber aus Glukose schon durch Zufuhr von 0.25 g sekundärem Natriumphosphat mit Cholsäure herabgesetzt wird. Dieser Glykogenwert ist fast gleich demjenigen ohne Zufuhr von Cholsäure. Es tritt also keine die Glykogenbildung fördernde Wirkung der Cholsäure auf, wenn 0.25 g sekundäres Natriumphosphat mit Cholsäure verfüttert wird. Bei Zufuhr von 0.35 g sekundären Natriumphosphates allein tritt die Glykogenbildung viel stärker auf, als bei Zufuhr derselben Menge von sekundärem Natriumphosphat mit Cholsäure. Wie schon in dem zweiten Versuch angegeben ist, wird die Glykogenbildung bei Zufuhr von 0.5 g sekundärem Natriumphosphat mit Cholsäure viel stärker herabgesetzt, als die bei Zufuhr sowohl derselben Menge von sekundärem Natriumphosphat als auch von Glukose allein.

Natürlich wird sie auch stärker als bei Zufuhr von Cholsäure allein herabgesetzt, und die die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure wird durch reichliche Zufuhr des sekundären Natriumphosphates aufgehoben.

Aus den obengenannten Daten geht hervor, dass die fördernde Wirkung der Cholsäure für die Glykogenbildung in der Leber durch das sekundäre Natriumphosphat vertreten wird, und man kann wohl schliessen, dass bei der Glykogenbildung in der Leber das sekundäre Natriumphosphat eine bedeutende Rolle spielt. Dieses sekundäre Natriumphosphat scheint mir dadurch geliefert zu werden, dass die Gallensäure von den Nucleinsäuren der Leber die Phosphorsäure frei macht, indem sie auf den Nucleinstoffwechsel in der Leber fördernd wirkt.

Die die Gallensäure vertretende Wirkung der sekundären Natriumphosphate bei der Glykogenbildung in der Leber scheint mir je nach den Zuckerarten ganz verschieden zu sein, weil die Glykogenbildung der Leber aus Fruktose bei Zufuhr von 0.5 g

sekundärem Natriumphosphat gefördert und durch die weitere Zufuhr von Cholsäure aufs neue gesteigert wird. Die Glykogenbildung aus Glukose, Mannose und Galaktose dagegen wird durch die Zufuhr derselben Mengen sekundären Natriumphosphates mit Cholsäure viel stärker als durch Zufuhr des Zuckers allein oder des Zuckers mit Cholsäure herabgesetzt. Diese Herabsetzung tritt je nach den Zuckerarten ganz verschieden auf. Was den Grund für den Unterschied in der Glykogenbildung der Zuckerarten bei Zufuhr des sekundären Natriumphosphates betrifft, so bedarf diese Frage weiterer Bearbeitung. Doch scheint mir die Verschiedenheit in der Glykogenbildung aus verschiedenen Zuckern bei Zufuhr des sekundären Natriumphosphates darauf zu beruhen, dass die ver-

TABELLE V.

	Zuckerarten g (pro kg)	Na. Cholat. g (pro kg)	Na ₂ HPO ₄ g (pro kg)	Leberglykogen %
A	Laevulose 3	—	—	2.748
	„ 3	0.3	—	4.178
	Glukose 3	—	—	1.891
	„ 3	0.3	—	2.831
	Mannose 3	—	—	1.809
	„ 3	0.3	—	2.641
	Galaktose 3	—	—	1.545
	„ 3	0.3	—	2.193
B	Glukose 3	—	0.5	1.835
	„ 3	—	0.35	2.175
	„ 3	—	0.25	2.361
	„ 3	—	0.1	2.047
C	„ 3	0.3	0.5	1.773
	„ 3	0.3	0.35	1.920
	„ 3	0.3	0.25	2.330
	„ 3	0.3	0.1	2.936

TABELLE VI.
(A)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
29/Sept.	2110	1700	41	2.488	Glukose 3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
"	1890	1660	40	2.300	
30	2030	1720	34	2.238	
"	2430	2100	42	1.975	
"	1970	1650	37	2.300	
1/Oct.	2130	1850	40	2.113	
"	1960	1650	36	1.800	

Durchschnittswert 2.175

(B)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
3/Oct.	1840	1500	36	1.988	Glukose 3 g Cholsäure 0.3 g Na ₂ HPO ₄ 3.5 g pro kg
"	2010	1690	32	1.988	
"	1980	1720	39	1.725	
"	1950	1620	37	1.600	
5	2100	1780	35	2.300	
"	1760	1420	30	1.785	
"	1790	1500	32	2.113	

Durchschnittswert 1.920

TABELLE VII.
(A)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
9/Sept.	2180	1860	40	2.488	Glukose 3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
"	1940	1610	35	2.488	
"	2190	1770	34	2.488	
10	2070	1710	36	1.975	
"	1880	1500	31	2.488	
"	1860	1490	33	2.238	
"	1930	1580	34	2.363	

Durchschnittswert 2.361

(B)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
1/Sept.	1880 1510	29	2.988	Glukose 3 g Cholsäure 0.3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
„	1930 1530	33	2.238	
„	2010 1570	33	2.300	
„	1800 1500	31	1.863	
2	1840 1500	34	2.238	
„	1710 1420	35	2.343	
„	2060 1650	39	2.343	

Durchschnittswert 2.330

TABELLE VIII.

(A)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
16/Sept.	1810 1530	30	1.975	Glukose 3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
„	2180 1890	40	2.175	
„	1910 1510	34	1.800	
17	2070 1760	33	1.988	
„	1840 1570	34	2.040	
21	2070 1750	43	2.175	
„	2200 1880	43	2.175	

Durchschnittswert 2.047

(B)

Datum	Körpergewicht Vor Nach dem Hungern	Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
18/Sept.	1780 1440	28	2.688	Glukose 3 g Cholsäure 0.3 g Na ₂ HPO ₄ 0.5 g pro kg
„	2080 1850	42	2.950	
„	1900 1520	34	2.888	
19	2140 1880	33	3.088	
„	1930 1600	36	3.088	
„	2200 1800	37	2.825	
21	1870 1580	38	3.025	

Durchschnittswert 2.936

mehrten OH-Ionen, die durch die Zufuhr des sekundären Natriumphosphates oder durch die Zufuhr der den Nucleinstoffwechsel der Leber fördernden und die sekundären Natriumphosphate vermehrenden Cholsäure bedingt sind, bei der Umwandlung der verschiedenen Zucker in eine gemeinsame Reaktionsform, die der Polymerisation der verschiedenen Zucker vorausgehen müsste, jeweils dem Zucker entsprechend sein müssen. Demnach scheinen mir mehr OH-Ionen für die Glykogenbildung aus Fruktose nötig zu sein als für die aus Glukose, weil einerseits das pH und gleichzeitig die Phosphorsäure in der Lebergalle durch die Zufuhr der Cholsäure gesteigert werden, wie es von Itoo(1930), Hatakeyama (1927) und Sekitoo (1929) bewiesen wurde, und andererseits die Glykogenbildung aus Fruchtzucker bei reichlicher Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat gefördert wird, während die Glykogenbildung aus Glukose, Mannose und Galaktose im Gegensatz dazu bei Zufuhr derselben Menge sekundären Natriumphosphates herabgesetzt wird.

Daher scheint mir die Glykogenbildung in der Leber nicht von der absoluten Menge des sekundären Natriumphosphates abhängig zu sein. Aber es ist eine Tatsache, dass die Gegenwart einer adäquaten Menge sekundären Natriumphosphates eine Erleichterung für die Glykogenbildung aus verschiedenen Zuckern auch in der Leber schaffen kann.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Glykogenbildung aus Fruktose in der Leber des Kaninchenorganismus wird durch die perorale Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat (0.5 g pro kg Körpergewicht) gefördert und durch weitere Zufuhr von Cholsäure noch mehr gesteigert, während die aus Glukose, Mannose und Galaktose durch Zufuhr derselben Menge sekundären Natriumphosphates sowohl mit als auch ohne Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt wird.

2. Die die Glykogenbildung aus Glukose, Mannose und Galaktose in der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure wird durch

eine reichliche Zufuhr des sekundären Natriumphosphates nicht nur aufgehoben, sondern vielmehr herabgesetzt, wenn es unter genau den gleichen Bedingungen in 0.5 g pro kg Körpergewicht sowohl mit als auch ohne Cholsäure an die Kaninchen per os verfüttert wird.

3. Die Glykogenbildung der Leber aus Glukose wird durch Zufuhr von 0.1–0.25 g sekundären Natriumphosphats pro kg Körpergewicht gefördert, aber im Gegensatz dazu mehr und mehr herabgesetzt, je mehr die zugeführte Menge sekundären Natriumphosphates gesteigert wird, bis die Glykogenbildung unter diejenige bei Zufuhr des Traubenzuckers allein herabgesetzt wird.

4. Die die Glykogenbildung aus Glukose fördernde Wirkung der Cholsäure wird durch Zufuhr von 0.1 g sekundären Natriumphosphats pro kg Körpergewicht gefördert, aber durch Zufuhr einer darüber hinausgehenden Menge herabgesetzt.

Diese herabsetzende Wirkung des sekundären Natriumphosphates wird immer mehr gesteigert, je mehr sekundäres Natriumphosphat zugeführt wird, bis sie unter die Glykogenbildung bei Zufuhr des Traubenzuckers allein herabgesetzt wird.

Aus den Daten geht hervor, dass die die Glykogenbildung aus Glukose in der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure durch das sekundäre Natriumphosphat vertreten wird, und man kann wohl schliessen, dass die die Glykogenbildung in der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure auf der von der den Nucleinstoffwechsel fördernden Eigenschaft der Cholsäure herrührenden Phosphatpufferung beruht.

5. Die die Glykogenbildung fördernde Wirkung des sekundären Natriumphosphates ist je nach den Zuckerarten ganz verschieden und von der Menge des zugeführten sekundären Natriumphosphates abhängig. Die Glykogenbildung aus Fruktose in der Leber wird durch reichliche Zufuhr von sekundärem Natriumphosphat gefördert, während die aus Glukose, Mannose und Galaktose dadurch unter diejenige bei Zufuhr von Zucker allein herabgesetzt wird. Dies scheint mir darauf zu beruhen, dass die OH-Ionen-

konzentration, welche von dem zugeführten oder durch die Cholsäure von Nuclein frei gewordenen sekundären Natriumphosphat geliefert wird, und welche die verschiedenen Zucker in eine gemeinsame Reaktionsform für die Glykogenbildung umzuwandeln vermag, je nach den Zuckerarten ganz verschieden sein muss.

LITERATURE

- Embden, G., Griesbach, W. u. Schmitz, E. (1914): Zeitschr. f. physiol. Chem., **93**, 1.
Embden, G. u. Laqueur, E. (1921): Zeitschr. f. physiol. Chem., **113**, 1.
Embden, G. u. Zimmermann, M. (1937): Zeitschr. f. physiol. Chem., **167**, 114.
Fuzita, S. (1930): Journ. of Bioch., **12**, Nr. 3.
Fuzita, S. (1930): Arb. med. Univ. Okayama., **2**, 151.
Fuziwara, K. Journ. of Bioch., **13**, 43.
Harden, A. u. Young, W. J. (1905): Proc. Chem. Soc., **21**, 189.
Harden, A. u. Young, W. J. (1911): Bioch. Zeitschr. **32**, 173 u. 177.
Hatakeyama, T. (1927): Journ. of Bioch., **8**, 261.
Hatakeyama, T. (1938): Journ. of Bioch., **8**, 371.
Isaac, S. (1914): Zeitschr. f. physiol. Chem., **89**, 78.
Ito, T. (1930): Arb. med. Univ. Okayama., **2**, 103.
Königsfeld, H. (1909): Z. klin. Med., **69**, 291.
Karasawa, R. (1926): Journ. of Bioch., **6**, 139.
Karasawa, R. (1927): Journ. of Bioch., **7**, 145.
Okamura, T. (1928): Journ. of Bioch., **8**, 391.
Robison, T. (1922): Journ. of Bioch., **16**, 809.
Sekitoo, T. (1922): Journ. of Bioch., **11**, 251.
Young, W. J. (1909): Proc. roy. soc., **81**, 528.
Young, W. J., Lebedew u. Griazmoff. (1812): Chem., Ber. **45**, 3255.

DIE WIRKUNG DER CHOLSÄURE AUF DIE KREATININAUSSCHIEDUNG BEI ZUFUHR VERSCHIEDENER VEGETATIVER NERVENGIFTE.

VON

AIJIRO TAKU.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 23. Dezember 1930)

In meinen früheren Mitteilungen habe ich berichtet (1929–1930), dass die Kreatininausscheidung im Harn beim Kaninchen durch Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt wird, indem die Cholsäure gegen Adrenalin antagonistisch wirkt. Es wurde auch interessanterweise festgestellt, dass die Injektion von Cholsäure auf die Kreatininausscheidung beim splanchnicotomierten Kaninchen keinen Einfluss mehr ausübt. Dadurch wurde wahrscheinlich gemacht, dass die Wirkungsweise der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung im Harn eine nervöse ist, und zwar nicht eine periphere, sondern mehr eine zentrale, und dass sie mit der Funktion der Splanchnicusnerven aufs engste verknüpft ist.

Neuerdings hat Tsuji (1930) in unserem Institut beobachtet, dass die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch Splanchnicusdurchschneidung aufgehoben wird, und auch Sekitoo (1930) ist in seinem Versuche über die hyperkalkämische Wirkung derselben zu einem analogen Resultate gekommen. Alle Versuchsergebnisse hinsichtlich der Wirkungsweise der Cholsäure in Bezug auf die Kreatininausscheidung, den Blutzuckerspiegel und den Blutkalkspiegel stimmen also gut miteinander überein.

Nun habe ich mich mit einem weiteren Versuche, den ich in der vorliegenden Mitteilung berichtete, beschäftigt, um den Zusam-

menhang zwischen der Wirkung der Cholsäure und der einiger zentral wirkender Medikamente zu erkennen, in der Hoffnung klarstellen zu können, ob vielleicht die Gallensäure unter Angriff des Nervenzentrums den Stoffwechsel im Organismus beeinflusst. Für diese Versuche benutzte ich Tetrahydro- β -naphthylamin, Koffein, Pilocarpin, Atropin und Chlorkalcium.

Tetrahydro- β -naphthylamin und Koffein wirken bekanntlich sympathisch zentral erregend und erhöhen stark die Kreatinmenge im Muskel.

Atropin wirkt im Gebiet des parasympathischen Systems lähmend, das Pilocarpin dagegen erregend. Atropin wirkt nach Araki (1925) auf den parasympathischen Muskeltonus herabsetzend, was kompensatorisch eine Erregung des sympathischen Muskeltonus zur Folge hat und zu einer vermehrten Kreatininausscheidung im Harn führt. Pilocarpin steht nach Kure und seinen Schülern in umgekehrtem Verhältnis zu Atropin und wirkt auf die Kreatininausscheidung herabsetzend.

Nach Kraus und Zondeck (1924–1925) vermitteln die doppeltgeladenen Kalciumionen die sympathische Reizung und die einfach geladenen Kaliumionen die vagische. In der Tat hat E. Borasch (1924) gefunden, dass beim Hunde Kalciumchlorid eine Hyperglykämie und Kaliumchlorid eine Hypoglykämie herbeiführt. Daher kann man wohl vermuten, dass Kalciumchlorid eine vermehrte und Kaliumchlorid eine verminderte Kreatininausscheidung zur Folge hat, und dass die Wirkung des Kalciumchlorides durch die Gallensäure herabgedrückt, die des Kaliumchlorids dagegen verstärkt werden muss.

Experimenteller Teil.

Als Versuchstiere benutzte ich immer männliche, gut genährte Kaninchen von ca. 2–3 kg Körpergewicht. Die Kreatininausscheidung wurde stets alle 2 Stunden festgestellt. Das übrige ist schon in meinen vorigen Mitteilungen angegeben. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

1. Versuche mit Tetrahydro- β -naphthylamin.

0,018–0,035 g von Tetrahydro- β -naphthylamin pro kg Körpergewicht wurden als 2%ige Olivenöl-Lösung dem Kaninchen subkutan verabreicht. Die Körpertemperatur wurde im Anus gemessen. Wie aus der Tabelle Ia ersichtlich ist, steigert das Tetrahydro- β -naphthylamin die Körpertemperatur des Tieres immer um 0,7–2,9°C und vermehrt die Kreatininausscheidung um 4,5–20,6%, wie schon von Riesser wahrgenommen wurde.

Zur Kontrolle obiger Versuche habe ich die Wirkung derselben Menge, in der das Tetrahydro- β -naphthylamin gelöst und zum Versuche benutzt wurde, von Olivenöl allein auf die Kreatininausscheidung und die Körpertemperatur geprüft. Aus der Tabelle Ib kann man ersehen, dass die Kreatininmenge und die Körpertemperatur nur eine geringe Schwankung zeigen, die aber in der Fehlergrenze der Versuche liegt, und dass das Olivenöl sowohl auf die Körpertemperatur als auch auf die Kreatininausscheidung keinen Einfluss ausüben kann.

TABELLE Ia.
Versuch mit Tetrahydro- β -naphthylamin.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitraum	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Körper- tempe- ratur	Bemerkungen
1.	2305	7,45– 9,45 a.m.	alkalisch	11,57	39,0° C.	Naphthylamin ← 0,01 g pro Kilo
		9,45–11,45 „	„	11,74	39,4° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	neutral	12,09	39,7° C.	
		1,45– 3,45 „	sauer	11,57	39,6° C.	
		3,45– 5,45 „	„	11,74	39,4° C.	
2.	2245	7,45– 9,45 a.m.	alkalisch	8,10	39,5° C.	„0,015 g“ ← pro Kilo
		9,45–11,45 „	neutral	8,44	40,3° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	„	8,90	39,8° C.	
		1,45– 3,45 „	„	8,62	39,4° C.	
		3,45– 5,45 „	sauer	8,27	39,5° C.	

3.	2580	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	12,46	38,8° C.	Naphthylamin ← 0,02 g pro Kilo
		9,45-11,45 "	neutral	12,86	39,5° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	"	13,28	39,8° C.	
		1,45- 3,45 "	"	13,73	39,6° C.	
		3,45- 5,45 "	sauer	12,66	39,6° C.	
4.	2360	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	11,41	38,8° C.	" "
		9,45-11,45 "	sauer	12,46	39,4° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	"	12,57	39,6° C.	
		1,45- 3,45 "	"	12,57	39,7° C.	
		3,45- 5,45 "	"	11,49	39,0° C.	
5.	2270	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	9,64	39,0° C.	"0,024 " ← pro Kilo
		9,45-11,45 "	neutral	10,07	39,8° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	"	10,52	40,1° C.	
		1,45- 3,45 "	sauer	11,42	40,8° C.	
		3,45- 5,45 "	"	9,88	39,6° C.	
6.	2145	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	7,68	39,5° C.	"0,025 " ← pro Kilo
		9,45-11,45 "	neutral	8,19	40,3° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	sauer	9,10	39,8° C.	
		1,45- 3,45 "	"	8,53	39,4° C.	
		3,45- 5,45 "	"	7,79	39,5° C.	
7.	2275	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	9,59	39,2° C.	" "
		9,45-11,45 "	neutral	10,13	40,7° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	"	11,57	41,0° C.	
		1,45- 3,45 "	sauer	10,80	39,8° C.	
		3,45- 5,45 "	"	9,53	39,6° C.	
8.	2205	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	10,52	39,3° C.	"0,035 " ← pro Kilo
		9,45-11,45 "	neutral	10,80	42,2° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	sauer	11,75	41,2° C.	
		1,45- 3,45 "	"	11,91	40,9° C.	
		3,45- 5,45 "	"	11,10	41,0° C.	

TABELLE Ib.
Versuch mit Olivenöl.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Körper- tempe- ratur	Bemerkungen
1.	2840	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	10,80	38,8° C.	Olivenöl ← 1,8 cem pro Kilo
		9,45-11,45 „	„	10,80	38,8° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	„	10,90	39,0° C.	
		1,45- 3,45 „	„	10,80	39,0° C.	
		3,45- 5,45 „	neutral	11,10	39,1° C.	
2.	2130	7,45- 9,45 a.m.	neutral	10,13	40,1° C.	„ „ ← „ „
		9,45-11,45 „	„	10,00	40,0° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	„	10,13	39,8° C.	
		1,45- 3,45 „	„	10,13	39,8° C.	
		3,45- 5,45 „	„	10,13	39,8° C.	
3.	2335	7,45- 9,45 a.m.	sauer	8,44	39,2° C.	„ „ ← „ „
		9,45-11,45 „	„	—	39,2° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	„	8,55	39,3° C.	
		1,45- 3,45 „	„	8,44	39,3° C.	
		3,45- 5,45 „	„	8,36	39,2° C.	
4.	2330	7,45- 9,45 a.m.	neutral	8,53	39,4° C.	„ „ ← „ „
		9,45-11,45 „	„	8,53	39,4° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	sauer	8,67	39,6° C.	
		1,45- 3,45 „	„	8,71	39,6° C.	
		3,45- 5,45 „	„	8,62	39,7° C.	
5.	2365	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	10,00	39,0° C.	„ „ ← 1,5 cem pro Kilo
		9,45-11,45 „	neutral	10,07	39,2° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	sauer	10,00	39,2° C.	
		1,45- 3,45 „	„	—	—	
		3,45- 5,45 „	„	—	—	
6.	2600	7,45- 9,45 a.m.	sauer	10,66	39,1° C.	„ „ ← „ „
		9,45-11,45 „	„	10,66	39,1° C.	
		11,45- 1,45 p.m.	„	10,80	39,2° C.	
		1,45- 3,45 „	„	—	—	
		3,45- 5,45 „	„	—	—	

2. Versuche mit Tetrahydro- β -naphthylamin und
Cholsäure.

Bei diesen Versuchen wurde zuerst 0,03 g Na-cholat pro kg Körpergewicht dem Kaninchen als 1%ige Lösung subkutan verabreicht, und nach Ablauf von 1 Stunde 0,01–0,024 g Tetrahydro- β -naphthylamin pro kg Körpergewicht subkutan gegeben. Aus der Tabelle Ic ist ersichtlich, dass das bekanntlich sympathisch zentral wirkende Tetrahydro- β -naphthylamin infolge des gesteigerten sympathischen Muskeltonus eine vermehrte Kreatininausscheidung und eine Steigerung der Körpertemperatur herbeiführt, die beiden durch die gleichzeitige Zufuhr von Cholsäure fast völlig ausgeglichen werden.

TABELLE Ic.
Versuch mit Cholsäure und Tetrahydro- β -naphthylamin.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Körper- tempe- ratur	Bemerkungen
1.	2553	7,45– 9,45 a.m.	alkalisch	10,00	38,8° C.	Cholsäure 0,03 g pro Kilo Naphthylamin 0,01 g pro Kilo
		9,45–11,45 „	neutral	9,76	38,8° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	„	9,76	38,8° C.	
		1,45– 3,45 „	sauer	9,64	38,6° C.	
		3,45– 5,45 „	„	9,88	38,9° C.	
2.	2700	7,45– 9,45 a.m.	alkalisch	9,88	38,9° C.	"Naphthylamin" 0,015 g pro Kilo
		9,45–11,45 „	„	9,88	39,0° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	neutral	10,13	39,2° C.	
		1,45– 3,45 „	sauer	10,13	39,4° C.	
		3,45– 5,45 „	„	10,13	39,3° C.	
3.	2450	7,45– 9,45 a.m.	alkalisch	8,10	39,4° C.	" " " " " "
		9,45–11,45 „	„	8,27	39,0° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	neutral	8,27	39,0° C.	
		1,45– 3,45 „	sauer	8,36	39,2° C.	
		3,45– 5,45 „	„	8,27	39,3° C.	

4.	2285	7,45– 9,45 a.m.	alkalisch	8,95	39,6° C.	"Naphthylamin ←0,02 g pro Kilo
		9,45–11,45 "	neutral	9,10	39,5° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	"	8,95	39,6° C.	
		1,45– 3,45 "	"	9,05	40,1° C.	
		3,45– 5,45 "	"	9,00	40,1° C.	
5.	2475	7,45– 9,45 a.m.	alkalisch	6,84	38,5° C.	" "
		9,45–11,45 "	"	6,86	38,9° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	"	6,92	38,9° C.	
		1,45– 3,45 "	neutral	6,92	39,2° C.	
		3,45– 5,45 "	"	6,86	39,2° C.	
6.	2285	7,45– 9,45 a.m.	sauer	8,76	38,5° C.	"Naphthylamin ←0,024 g
		9,45–11,45 "	"	8,71	38,4° C.	
		11,45– 1,45 p.m.	"	9,16	39,0° C.	
		1,45– 3,45 "	"	9,00	39,1° C.	
		3,45– 5,45 "	"	9,10	39,3° C.	

3. Versuche mit Koffein.

In diesem Fall wurden 0,1–0,2 g von Koffein-Natriumbenzoat als 1%ige Natriumsalzlösung subkutan gegeben. Wie aus der Tabelle IIa ersichtlich ist, vermehrt das sympathisch-zentral wirkende Koffein die Kreatininausscheidung um 6,5–27,3%, wie auch schon von Riesser festgestellt wurde.

4. Versuche mit Koffein und Cholsäure.

In den nächsten Stunden nach der subkutanen Zufuhr von 0,03 g Cholsäure als 1%iger Natriumsalzlösung pro kg Körpergewicht wurde 0,1 g Koffein als 1%ige Lösung subkutan gegeben. Wie in der Tabelle IIb gezeigt wird, gleicht die Cholsäure die Wirkung des Koffeins auf die Kreatininausscheidung aus. Durch gleichzeitige Zufuhr von Cholsäure konnte ich keine gesteigerte Vermehrung der Kreatininausscheidung durch Koffein erzielen.

TABELLE IIa.
Versuch mit Koffein.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2700	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	12,37	Koffein ← 0,1 g pro Kilo
		9,45-11,45 "	neutral	12,46	
		11,45- 1,45 p.m.	"	12,86	
		1,45- 3,45 "	alkalisch	13,17	
		3,45- 5,45 "	neutral	12,46	
2.	1960	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	10,39	" " " ← 0,15 g pro Kilo
		9,45-11,45 "	"	11,10	
		11,45- 1,45 p.m.	neutral	12,18	
		1,45- 3,45 "	sauer	11,57	
		3,45- 5,45 "	"	12,09	
3.	2255	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	7,71	" " " ← 0,17 g pro Kilo
		9,45-11,45 "	"	7,94	
		11,45- 1,45 p.m.	"	8,90	
		1,45- 3,45 "	"	8,71	
		3,45- 5,45 "	"	9,00	
4.	2550	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	11,57	" " " ← 0,2 g pro Kilo
		9,45-11,45 "	neutral	11,91	
		11,45- 1,45 p.m.	sauer	12,46	
		1,45- 3,45 "	"	14,09	
		3,45- 5,45 "	"	14,73	
5.	2205	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	8,71	" " " ← 0,2 g pro Kilo
		9,45-11,45 "	"	9,21	
		11,45- 1,45 p.m.	neutral	10,13	
		1,45- 3,45 "	"	9,31	
		3,45- 5,45 "	"	8,90	

TABELLE IIb.

Versuch mit Cholsäure und Koffein.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2815	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	10,80	Cholsäure 0,03 g pro Kilo Koffein 0,1 g pro Kilo
		9,45-11,45 "	neutral	10,95	
		11,45- 1,45 p.m.	"	11,10	
		1,45- 3,45 "	"	11,03	
		3,45- 5,45 "	"	11,03	
2.	1800	7,45- 9,45 a.m.	neutral	6,69	" "
		9,45-11,45 "	"	6,75	
		11,45- 1,45 p.m.	"	6,78	
		1,45- 3,45 "	sauer	6,75	
		3,45- 5,45 "	"	6,69	
3.	2615	7,45- 9,45 a.m.	sauer	8,53	" "
		9,45-11,45 "	"	8,62	
		11,45- 1,45 p.m.	"	8,71	
		1,45- 3,45 "	"	8,90	
		3,45- 5,45 "	—	—	
4.	2465	7,45- 9,45 a.m.	sauer	10,00	" "
		9,45-11,45 "	"	9,76	
		11,45- 1,45 p.m.	"	9,53	
		1,45- 3,45 "	"	9,64	
		3,45- 5,45 "	—	—	
5.	2250	7,45- 9,45 a.m.	alkalisch	10,66	" "
		9,45-11,45 "	neutral	10,39	
		11,45- 1,45 p.m.	"	10,52	
		1,45- 3,45 "	"	10,52	
		3,45- 5,45 "	"	10,46	

Die durch Adrenalin erzeugte Kreatininvermehrung im Harn wurde durch gleichzeitige Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt, wie ich schon in meinen vorigen Mitteilungen berichtet habe. Zwischen den Sympathikusgiften Tetrahydro- β -naphthylamin oder Koffein und Adrenalin besteht der charakteristische Unterschied, dass erstere im allgemeinen zentral, letzteres fast stets peripher angreift, obwohl ihre Wirkungen je nach dem Mengenverhältnis verschieden sind. Auf Grund der Daten kommt man nun zu dem Schlusse, dass die Wirkung der Cholsäure nicht nur die Wirkung des sympathisch mehr peripher angreifenden Adrenalins, sondern auch die Wirkung des sympathisch mehr zentral angreifenden Tetrahydro- β -naphthylamins oder Koffeins herabsetzt.

5. *Versuche mit Pilocarpin.*

Hierbei wurden 1–1,5 mg Pilocarpinhydrochlorid pro kg Körpergewicht als 0,1%ige Lösung subkutan verabreicht. Pilocarpin setzt nach Kure und seinen Schülern die Kreatininausscheidung herab, indem es auf den Parasympathikus erregend und kompensatorisch auf den Splanchnikus lähmend wirkt. Wider mein Erwarten wirkte Pilocarpin in meinem Versuche, wie aus der Tabelle IIIa zu ersehen ist, auf die Kreatininausscheidung nicht nur nicht herabsetzend, sondern in den meisten Fällen sogar vermehrend, und zwar beträgt die Vermehrung etwa 5,9–11,1%.

6. *Versuche mit Pilocarpin und Cholsäure.*

Eine Stunde nach der subkutanen Zufuhr von 0,03 g Cholsäure pro kg Körpergewicht als 1%ige Natriumsalzlösung wurden 1–1,5 mg Pilocarpin pro kg Körpergewicht als 0,1%ige Lösung subkutan gegeben. Wie in der Tabelle IIIb angegeben ist, kommt weder die Wirkung des Pilocarpins noch die der Cholsäure bei gleichzeitiger Zufuhr beider Substanzen zum Vorschein. Zur Erklärung dieser Resultate müssen noch weitere Versuche angestellt werden.

TABELLE IIIa.

Versuch mit Pilocarpin.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2050	7,15- 9,15 a.m.	alkalisch	7,36	Pilocarpin 1,0 mg pro Kilo
		9,15-11,15 „	sauer	7,94	
		11,15- 1,15 p.m.	„	7,79	
		1,15- 3,15 „	„	7,36	
		3,15- 5,15 „	„	7,35	
2.	2160	7,15- 9,15 a.m.	alkalisch	8,19	Pilocarpin 1,2 mg pro Kilo
		9,15-11,15 „	neutral	9,00	
		11,15- 1,15 p.m.	sauer	8,44	
		1,15- 3,15 „	„	8,53	
		3,15- 5,15 „	„	8,27	
3.	2280	7,15- 9,15 a.m.	alkalisch	8,10	Pilocarpin 1,5 mg pro Kilo
		9,15-11,15 „	sauer	8,76	
		11,15- 1,15 p.m.	„	9,00	
		1,15- 3,15 „	„	8,53	
		3,15- 5,15 „	„	8,53	
4.	2455	7,15- 9,15 a.m.	alkalisch	9,58	Pilocarpin ← „ „
		9,15-11,15 „	„	10,13	
		11,15- 1,15 p.m.	„	10,38	
		1,15- 3,15 „	„	9,64	
		3,15- 5,15 „	„	9,82	
5.	2660	7,15- 9,15 a.m.	sauer	10,07	Pilocarpin ← „ „
		9,15-11,15 „	„	10,66	
		11,15- 1,15 p.m.	„	10,13	
		1,15- 3,15 „	„	10,38	
		3,15- 5,15 „	„	10,32	

TABELLE IIIb.

Versuch mit Cholsäure und Pilocarpin.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2275	7,15- 9,15 a.m.	sauer	9,53	Cholsäure 0,03 gm pro Kilo Pilocarpin 1,0 mg pro Kilo
		9,15-11,15 „	„	9,53	
		11,15- 1,15 p.m.	„	9,37	
		1,15- 3,15 „	„	9,53	
		3,15- 5,15 „	—	—	
2.	2000	7,15- 9,15 a.m.	sauer	9,67	" "
		9,15-11,15 „	„	9,64	
		11,15- 1,15 p.m.	„	9,42	
		1,15- 3,15 „	—	—	
		3,15- 5,15 „	—	—	
3.	2230	7,15- 9,15 a.m.	sauer	8,27	" "Pilocarpin 1,2 mg pro Kilo
		9,15-11,15 „	„	8,23	
		11,15- 1,15 p.m.	„	8,19	
		1,15- 3,15 „	„	8,19	
		3,15- 5,15 „	„	8,19	
4.	2200	7,15- 9,15 a.m.	alkalisch	7,14	" "
		9,15-11,15 „	sauer	7,05	
		11,15- 1,15 p.m.	„	7,17	
		1,15- 3,15 „	„	7,14	
		3,15- 5,15 „	„	7,17	
5.	2350	7,15- 9,15 a.m.	neutral	8,71	" "Pilocarpin 1,5 mg pro Kilo
		9,15-11,15 „	sauer	8,58	
		11,15- 1,15 p.m.	„	8,62	
		1,15- 3,15 „	„	8,80	
		3,15- 5,15 „	„	8,80	

7. *Versuche mit Atropin.*

Bei diesem Versuche wurden 0,4–1,0 mg Atropin als 1%ige Sulfatlösung pro kg Körpergewicht subkutan gegeben. Das Atropin vermehrt, wie in der Tabelle IVa gezeigt wird, die Kreatininausscheidung um 5,4–11,2%. Das Atropin bewirkt eine Herabsetzung des parasympathischen Muskeltonus, deren Folge kompensatorisch die Erregung des sympathischen Muskeltonus ist, und führt zu einer vermehrten Kreatininausscheidung, wie schon von Araki angenommen wurde.

8. *Versuche mit Atropin und Cholsäure.*

Eine Stunde nach der subkutanen Zufuhr von Cholsäure, von der 0,03 g als 1%ige Natriumsalzlösung gegeben wurden, habe ich 0,4–0,5 mg Atropin pro kg Körpergewicht als 0,1%ige Sulfatlösung subkutan injiziert. Tabelle IVb zeigt, dass die Kreatininvermehrung im Harn durch Atropin bei gleichzeitiger Zufuhr von Cholsäure ausgeglichen wird.

9. *Versuche mit Chlorkalzium.*

Hier habe ich 0,07–2,0 g Chlorkalzium pro kg Körpergewicht in 5%iger Lösung subkutan gegeben. Das Kalziumion vermittelt nach Kraus und Zondek eine sympathische Reizung. Tabelle Va zeigt, dass die Injektion von Chlorkalzium eine um 13,1–35,0% vermehrte Kreatininausscheidung im Harn zur Folge hat. Dieses Sympathikusgift scheint auch den sympathischen Muskeltonus zu steigern.

10. *Versuche mit Chlorkalzium und Cholsäure.*

2 Stunden nach der subkutanen Zufuhr von Cholsäure, von der 0,03 g pro kg Körpergewicht als 1%ige Natriumsalzlösung verabreicht wurden, habe ich 0,08–0,15 g Kalziumchlorid pro kg Körpergewicht in 5%iger Lösung subkutan gegeben. Die Chlorkalziumwirkung auf die Kreatininausscheidung wird durch gleichzeitige Zufuhr von Cholsäure aufgehoben, wie aus der Tabelle Vb ersichtlich ist.

TABELLE IVa.

Versuch mit Atropin.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2540	7,05- 9,05 a.m.	alkalisch	11,10	Atropin ← 0,4 mg pro Kilo
		9,05-11,05 „	sauer	11,41	
		11,05-1,05 p.m.	„	11,91	
		1,05- 3,05 „	„	11,91	
		3,05- 5,05 „	„	11,57	
2.	2240	7,05- 9,05 a.m.	alkalisch	11,74	← „ „
		9,05-11,05 „	sauer	12,37	
		11,05-1,05 p.m.	„	11,91	
		1,05- 3,05 „	„	11,57	
		3,05- 5,05 „	„	11,91	
3.	2800	7,05- 9,05 a.m.	alkalisch	11,49	Atropin ← 0,6 mg pro Kilo
		9,05-11,05 „	sauer	11,57	
		11,05-1,05 p.m.	„	12,46	
		1,05- 3,05 „	„	12,56	
		3,05- 5,05 „	„	12,46	
4.	2470	7,05- 9,05 a.m.	alkalisch	11,10	← „ „
		9,05-11,05 „	sauer	12,09	
		11,05-1,05 p.m.	„	11,74	
		1,05- 3,05 „	„	11,25	
		3,05- 5,05 „	„	11,42	
5.	2660	7,05- 9,05 a.m.	alkalisch	11,74	Atropin ← 1,0 mg pro Kilo
		9,05-11,05 „	neutral	12,09	
		11,05-1,05 p.m.	sauer	12,46	
		1,05- 3,05 „	„	13,06	
		3,05- 5,05 „	„	12,00	

TABELLE IVb.

Versuch mit Cholsäure und Atropin.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2305	7,05- 9,05 a.m.	alkalisch	10,13	Cholsäure ← 0,03 mg pro Kilo Atropin 0,4 mg pro Kilo
		9,05-11,05 „	„	9,88	
		11,05-1,05 p.m.	„	9,76	
		1,05- 3,05 „	sauer	10,13	
		3,05- 5,05 „	„	10,19	
2.	2315	7,05- 9,05 a.m.	sauer	8,95	← „ „ „ „
		9,05-11,05 „	„	9,00	
		11,05-1,05 p.m.	„	9,10	
		1,05- 3,05 „	„	9,21	
		3,05- 5,05 „	„	9,21	
3.	2175	7,05- 9,05 a.m.	alkalisch	7,54	← „ „ Atropin 0,5 mg pro Kilo
		9,05-11,05 „	„	7,43	
		11,05-1,05 p.m.	sauer	7,36	
		1,05- 3,05 „	„	7,23	
		3,05- 5,05 „	„	7,43	
4.	2355	7,05- 9,05 a.m.	neutral	8,44	← „ „ „ „
		9,05-11,05 „	„	8,53	
		11,05-1,05 p.m.	sauer	8,53	
		1,05- 3,05 „	„	8,44	
		3,05- 5,05 „	„	8,53	
5.	2250	7,05- 9,05 a.m.	neutral	9,05	← „ „ „ „
		9,05-11,05 „	„	9,00	
		11,05-1,05 p.m.	sauer	9,00	
		1,05- 3,05 „	„	8,95	
		3,05- 5,05 „	„	9,00	

TABELLE Va.
Versuch mit Chlorealcium.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2315	7,40- 9,40 a.m.	alkalisch	8,58	Chlorealcium ←0,07 g pro Kilo
		9,40-11,40 „	„	8,80	
		11,40- 1,40 p.m.	„	9,70	
		1,40- 3,40 „	neutral	9,53	
		3,40- 5,40 „	„	9,37	
2.	2370	7,40- 9,40 a.m.	alkalisch	9,31	„ „ ←0,08 g pro Kilo
		9,40-11,40 „	„	10,66	
		11,40- 1,40 p.m.	„	9,88	
		1,40- 3,40 „	„	9,64	
		3,40- 5,40 „	sauer	9,53	
3.	2810	7,40- 9,40 a.m.	alkalisch	11,74	„ „ ←0,1 g pro Kilo
		9,40-11,40 „	„	12,66	
		11,40- 1,40 p.m.	„	13,50	
		1,40- 3,40 „	„	12,86	
		3,40- 5,40 „	sauer	13,50	
4.	2660	7,40- 9,40 a.m.	alkalisch	10,45	„ „ ←0,12 g pro Kilo
		9,40-11,40 „	„	12,00	
		11,40- 1,40 p.m.	„	11,57	
		1,40- 3,40 „	neutral	11,57	
		3,40- 5,40 „	sauer	10,95	
5.	2250	7,40- 9,40 a.m.	alkalisch	8,02	„ „ ←0,15 g pro Kilo
		9,40-11,40 „	„	8,94	
		11,40- 1,40 p.m.	„	9,31	
		1,40- 3,40 „	„	9,10	
		3,40- 5,40 „	sauer	8,71	
6.	2260	7,40- 9,40 a.m.	sauer	10,00	„ „ ←0,2 g pro Kilo
		9,40-11,40 „	neutral	13,50	
		11,40- 1,40 p.m.	„	12,46	
		1,40- 3,40 „	—	—	
		3,40- 5,40 „	—	—	

TABELLE Vb.

Versuch mit Cholsäure und Chlorecalcium.

Ver- such- Nr.	Körper- gewicht (g)	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin- menge (mg)	Bemerkungen
1.	2845	7,40– 9,40 a.m.	neutral	11,74	Cholsäure ← 0,03 g pro Kilo Chlorecalcium 0,08 g pro Kilo
		9,40–11,40 „	alkalisch	11,66	
		11,40– 1,40 p.m.	„	11,57	
		1,40– 3,40 „	„	11,74	
		3,40– 5,40 „	„	11,74	
2.	2350	7,40– 9,40 a.m.	alkalisch	9,76	← „ „ Chlorecalcium 0,09 g pro Kilo
		9,40–11,40 „	„	9,76	
		11,40– 1,40 p.m.	„	9,76	
		1,40– 3,40 „	„	9,64	
		3,40– 5,40 „	„	9,76	
3.	2350	7,40– 9,40 a.m.	neutral	10,66	← „ „ Chlorecalcium 0,1 g pro Kilo
		9,40–11,40 „	alkalisch	10,39	
		11,40– 1,40 p.m.	„	10,25	
		1,40– 3,40 „	„	10,39	
		3,40– 5,40 „	„	10,52	
4.	2260	7,40– 9,40 a.m.	alkalisch	8,10	← „ „ Chlorecalcium 0,12 g pro Kilo
		9,40–11,40 „	„	8,27	
		11,40– 1,40 p.m.	„	8,44	
		1,40– 3,40 „	„	8,27	
		3,40– 5,40 „	„	8,10	
5.	2245	7,40– 9,40 a.m.	neutral	8,95	Cholsäure ← 0,03 g pro Kilo Chlorecalcium 0,13 g pro Kilo
		9,40–11,40 „	alkalisch	9,10	
		11,40– 1,40 p.m.	„	9,31	
		1,40– 3,40 „	„	9,37	
		3,40– 5,40 „	„	9,21	
6.	2460	7,40– 9,40 a.m.	sauer	9,10	← „ „ Chlorecalcium 0,15 g pro Kilo
		9,40–11,40 „	alkalisch	9,53	
		11,40– 1,40 p.m.	„	9,53	
		1,40– 3,40 „	„	9,42	
		3,40– 5,40 „	„	9,00	

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Wirkung des Tetrahydro- β -naphthylamins, Koffeins, Pilocarpins, Atropins und des Chlorkalciums auf die Kreatininausscheidung wurde beim Kaninchen untersucht. Alle diese vegetativen Nervengifte, mit Ausnahme des Pilocarpins, vermehren die Kreatininausscheidung.

2. Der Zusammenhang zwischen den Wirkungen obiger vegetativer Nervengifte und der Wirkung der Cholsäure wurde verfolgt. Die Wirkungen der untersuchten vegetativen Nerven- bzw. sympathischen Gifte wurden alle durch die gleichzeitige Zufuhr von Cholsäure aufgehoben.

3. Auf Grund dieser Daten kann man unter Berücksichtigung der Resultate meiner vorläufigen Mitteilungen wohl mit Recht behaupten, dass die Wirkung der Cholsäure mit dem vegetativen bzw. sympathischen Nervensystem äusserst eng verknüpft ist, und dass sie nicht als eine periphere, sondern vielmehr als eine zentrale Wirkung zu betrachten ist.

LITERATUR

- Araki, S. (1925): Takio Igakkai Zassi, **39**, 916.
Barasch, E. (1924): Kl. Wochenschr., **3**, 1618.
Kaziro K. und Taku, A. (1929): J. of Biochem., **11**, 203.
Kraus, F. und Zondek, S. G. (1924-1925): Kl. Wochenschr., **3**, 707.
Sekitoo, T. (1930): J. of Biochem., **11**, 391.
Taku, A. (1930): J. of Biochem., **12**, 323.
Tsuji, K. (1930): J. of Biochem., **12**, 139.

SUR LA PURIFICATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

Par

SEIICHI OHYAMA.

*(Laboratoire de Biochimie à l'Institut pour les maladies infectieuses.
Université de Tôkyo. Directeur: Prof. T. Kohmoto.)*

(Reçu pour la publication, le 4 décembre 1930)

La grande toxicité de la toxine diphtérique et la propriété qu'elle possède de ne pas dialyser laissent supposer que cette substance a une grande énergie de surface. Les différents ferments qui se trouvent dans la nature ont, d'autre part, des ressemblances frappantes avec la toxine dans leurs propriétés et leurs modes d'action.

Lorsqu'on songe à purifier une toxine, les méthodes employées pour la purification des ferments s'imposent d'elles-mêmes à notre mémoire.

De 1919 à 1925, Richard Willstätter a fait paraître une série de travaux qui ont inauguré une ère nouvelle pour la méthode de purification des ferments.

Cette méthode d'adsorption et d'élution comme l'appelle l'auteur ne manqua pas d'attirer l'attention d'un certain nombre de bactériologistes et de bio-chimistes désireux de l'appliquer à la purification des toxines et la méthode, surtout celle qui utilise l'hydroxyde d'alumine et le kaolin, fut étudiée par quelques-uns d'entre eux sous ce rapport. Malheureusement ce procédé entraînait des pertes considérables de toxine et son étude fut bientôt abandonnée. Cependant le problème de la purification de la toxine diphtérique avait déjà été envisagé d'un tout autre point de vue par L. Brieger dès 1896.

Ce savant, connu par de longs travaux sur les "biogenen Aminen", fut le premier à employer le ZnCl_2 pour précipiter la toxine de dedans la toxine brute.

Après diverses autres manipulations il arriva à être en possession d'une toxine ayant, selon lui, aucune des réactions d'albumoses et de peptones.

Un examen attentif des procédés employés par Brieger laisse pourtant des doutes quant à l'exactitude des faits avancés. Il a dû certainement réussir à débarrasser la toxine mère d'une bonne partie des albumoses et peptones qu'elle contient comme impuretés ; mais l'obtention d'une forte toxine sans trace d'albumoses est douteuse et Brieger aurait tout au plus réussi à avoir une forte toxine avec une réaction du biuret faible.

En 1928, Hosoya, partant de la méthode de Brieger, a amélioré la méthode de purification des toxines, et a obtenu une puissante toxine sans réaction du biuret.

L'emploi du ZnCl_2 dans ces méthodes, n'a pas été jusqu'ici expliqué, le mécanisme de la purification non plus. Vu l'insuffisance des données, on pouvait être amené à perdre une bonne partie de la toxine en train d'être traitée et même à voir subitement la toxicité d'une toxine devenir nulle sans pouvoir en saisir la raison. Le mécanisme de la purification devait donc être abordé pour mettre au point les divers procédés employés. En pensant aux caractères chimio-physiques de la toxine, il m'a semblé plus rationnel de supposer que dans le procédé de précipitation de la toxine par le ZnCl_2 , celui-ci, au lieu de se combiner directement avec la toxine, devait réagir avec d'autres substances formant un corps doué d'une grande activité superficielle et pouvant fixer la toxine.

Ce serait le mécanisme de l'adsorption tel que Willstätter l'avait proposé pour la purification des ferments.

Il fallait néanmoins : premièrement constater que des corps d'une grande affinité pour le ZnCl_2 , tels que les phosphates ou l'ammoniaque, se trouvaient dans la toxine brute et, en second lieu, prouver que la substance résultant de la combinaison de ces corps pouvait adsorber la toxine d'une manière sélective.

La toxine brute contient toujours des phosphates ; la toxine,

après 6 heures de dégraissage par l'éther, a une teneur de 18,9–26,7 mg P pour 100 cc.

L'ammoniaque, elle aussi, est un des composants de la toxine brute; sa teneur en NH_3 est de 7.0–8,5 cc. n. NH_3 pour 100 cc.

On arrive d'autre part à déphosphater une toxine brute sans presque changer sa toxicité, en la traitant par du NH_4Cl , NH_3 , Acetate de Mg; les phosphates sont alors éliminés comme $\text{PO}_4\text{--NH}_3\text{--Mg}$. Une toxine déphosphatée par ce procédé et dialysée ne précipite plus par adjonction de ZnCl_2 ; mais, si on ajoute en outre de l'ammoniaque ou bien des phosphates, un précipité volumineux se forme, qui adsorbe la toxine de préférence aux corps avec réaction du biuret, seulement si le ph du milieu est bien choisi.

par exemple :

Toxine brute 100 cc. + n. NH_4Cl 10 cc. + n. NH_3 6.0 cc. + 10% Acetate de Mg. 10 cc. Après avoir bien agité le tout, on le laisse pendant 30 minutes, tout en ayant soin de la mélanger de temps à autre, après quoi on filtre et l'on ajoute au filtrat qui contient la toxine une peu d'acide acétique (environ 2 cc. d'acide acétique à 10%) pour obtenir une réaction faiblement alcaline; puis on dialyse pendant (24–48 heures).

Ainsi déphosphatée et dialysée, la toxine ne perd pas en toxicité. On ajoute à cette toxine 10 cc. de ZnCl_2 à 20% : aucun précipité ne se forme; mais, si on ajoute en plus 10 cc. de m/10 phosphate (ph 7,0), ou 4 cc. n. NH_3 , un précipité se forme, qui contient la presque totalité de la substance toxique.

Le liquide surnageant, dont le ph est respectivement celui du premier 6,1, celui du second 6,4, n'est pas toxique et la réaction du biuret est fortement positive.

Des expériences précédentes nous pouvons déduire que si dans une toxine déphosphatée et dialysée la naissance d'une combinaison chimique telle que $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ou phosphate de Zinc se produit, celle-ci adsorbera la toxine, lorsque le ph du milieu sera de 6,0–6,5 mieux que les corps avec réaction de biuret.

Nous pouvons maintenant saisir le vrai sens de l'adjonction de

ZnCl_2 dans les méthodes de purification décrites jusqu'ici : c'était pour obtenir du phosphate de Zinc ou du $\text{Zn}(\text{OH})_2$ doué d'une action adsorbante sélective sur la toxine.

Si la réaction utilisée pour séparer la toxine devait être comprise non comme une réaction entre deux substances se combinant directement pour former un sel spécial, mais comme une réaction d'adsorption par le $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ou le phosphate de Zinc, il était dès lors à présumer que d'autres métaux encore pouvaient servir de même „d'adsorbens“ envers la toxine.

L'analogie a été en effet constatée existante parmi d'autres métaux.

Parmi les phosphates : les phosphates de Ca, Sr, Ba (ph 6,9–6,0).

Parmi les hydroxydes : l'hydroxyde d'étain $\text{Sn}(\text{OH})_2$ (ph 6,4–5,8) sont de bons adsorbants de toxine.

MÉTHODE D'ADSORPTION PAR LES PHOSPHATES DE Ca, Sr, Ba.

par exemple :

Première partie. A 100 cc. de toxine brute (ph 8,7 toxicité : m.l.d. 0.005) on ajoute 10 cc. m/2 CaCl_2 [ou de BaCl_2 , CrCl_2] et 20 cc. de m/10 phosphate (ph 6,8). Le tout bien mélangé est mis pendant 45 min.– 1 h. à 37°C , en ayant soin de mélanger le contenu pendant ce laps de temps 3 ou 4 fois. Après centrifugation, le liquide surnageant est décanté, son ph est de 6,9, il est très peu toxique. Le précipité une fois lavé avec de l'eau est d'une grande toxicité. Traité avec 20 cc. d'oxalate d'ammonium (m/4) il se décompose en formant un précipité d'oxalate de calcium. Après centrifugation, le liquide surnageant qui contient la presque totalité de la substance toxique est décanté; celui-ci a une réaction du biuret positive bien que très affaibli par rapport à la toxine mère.

Seconde partie.

Pour déphosphater la toxine, on ajoute m/5 MnCl_2 20 cc., m/4 oxalate NH_4 20 cc., et n. NH_3 2.6–3.0 cc.

Les phosphates sous forme de $\text{PO}_4\text{--NH}_3\text{--Mn}$ sont précipités et éliminés par centrifugation. Au liquide clair surnageant on ajoute

m/5 MnCl_2 5,0 cc. et en mélangeant on ajoute du NH_4S incolore fraîchement préparé, jusqu'à élimination de Mn sous forme de MnS .

Après centrifugation, on décante le liquide surnageant et on ajoute un peu d'acide acétique jusqu'à réaction faiblement alcaline, et on dialyse 18-24 h. à l'eau courante. On obtient ainsi 110 cc. d'une toxine claire légèrement jaunâtre dont la toxicité est de m.l.d. 0,007.

MÉTHODE D'ADSORPTION PAR L'HYDROXYDE D'ÉTAIN.

Par exemple.

A 100 cc. de la toxine brute (ph 8,7 m.l.d. 0.005) on ajoute n. NH_4Cl 10 cc. une quantité déterminée m d'ammoniaque et 0.9 g. de chlorure d'étain en mélangeant rapidement avec un mélangeur en verre.

Si la quantité d'ammoniaque ajoutée est graduellement baissée à partir de 5.4 cc., on voit la toxicité du liquide surnageant décroître en même temps que son ph. comme le montre le tableau N° 1.

La toxicité du liquide surnageant devient presque nulle à partir de ph 6,6.

Le précipité au contraire augmente en toxicité à mesure que le liquide surnageant en perd, pour atteindre son maximum au environ de ph 6,5.

Pour 100 cc. de toxine brute et 10 cc. n. NH_4Cl avec 3,5 cc. n. NH_3 , l'addition de 0.9 g. de SnCl_2 produit un milieu ph. 6,3. Le précipité formé, lavé une fois avec de l'eau distillée, contient la majeure partie de la substance toxique.

Seconde partie.

Au précipité ainsi obtenu on ajoute 20 cc. de 5% d'oxalate NH_4 ou 10% de citrate NH_4 et quelques cc. d'un S. NH_4 incolore fraîchement préparé pour éliminer le Sn sous forme de SnS .

Le liquide surnageant, après centrifugation, contenant la presque totalité de la substance toxique est additionné d'un peu d'acide acétique jusqu'à obtention d'une réaction faiblement

alcaline et mis dans un dialyseur pendant 18-24 h.

On a, après la dialyse, un liquide clair légèrement jaune; c'est une toxine purifiée dont la toxicité est de m.l.d. 0.004-0.003.

Dans les méthodes d'adsorption décrites ci-dessus, la première partie des manipulations visait à adsorber plus ou moins sélectivement la toxine; dans la seconde partie qui était une élution, j'ai adopté la méthode préconisée par Hosoya pour éliminer le Zinc, c'est à dire la production d'un sulphide métallique approprié en réaction alcaline.

Dans la méthode basée sur les phosphates, le sulphide de Mn, dans celle basée sur le $\text{Sn}(\text{OH})_2$, le sulphide d'étain ont été employés. Ces sulphides en réaction alcaline n'adsorbent pas la toxine et éliminent le reste des corps avec réaction du biuret. En étudiant ainsi le mécanisme de la purification d'une toxine et en partant de la méthode de Brieger et de celle de Hosoya, j'ai mis au point une purification de la toxine avec d'autres métaux. Quelle que soit la méthode employée, on obtient une toxine purifiée dont la toxicité n'est pas sensiblement amoindrie par rapport à la toxine mère, mais qui ne possède aucune des réactions suivantes: celle de protéine, telle que: réaction du biuret, réaction xanthoprotéique, réaction de Millon, réaction de Hopkin Cole's, réaction du S, réaction de Heller; celle de sucre telle que: réaction de Molisch, réaction de Nylander, réaction de Seliwanof, réaction à l'orcine.

La toxine diphtérique étant une substance d'un grande toxicité, on ne pourrait conclure qu'une toxine purifiée ayant gardé sa toxicité, mais ayant perdu quelques réactions des protéines et des sucres, ne puisse pas être constituée par ces derniers. Il serait intéressant par conséquent d'étudier quelle est l'action de ferments tel que la trypsine ou la takadiastase sur la toxine diphtérique.

MATÉRIAUX DE L'ESSAI.

1. *Toxine diphtérique purifiée.*

La toxine diphtérique, produite par le bac. Park-Williams N° 8,

filtrée sur bougie Chamberland L₃, est purifiée par la méthode d'adsorption au $\text{Sn}(\text{OH})_2$ décrite antérieurement; elle a un volume total de 500 cc. environ; elle est légèrement citrin. Sa toxicité pour le cobaye de 250 g était de m.l.d.: 1/175~1/150 cc., après conservation à la glacière pendant un mois, elle a été trouvée être de m.l.d.: 1/100~1/120 cc.. Les expériences qui seront décrites ultérieurement ont été faites avec cette toxine. (Pour assurer l'asepsie, on a ajouté à cette toxine du toluène pure).

Les préparations de ferment du commerce étant contaminées avec trop d'impuretés, des ferments purifiés comme suit ont été employés.

2. *Trypsine purifiée.*

200 g. de pancréas de porc finement haché, a été traité avec 1 litre d'acétone pur, puis séché dans le vide. On obtient une poudre blanche que l'on conserve dans une bouteille hermétiquement fermée. Cette poudre est diluée dans de l'eau à raison de 1% et filtrée sur papier. A 200 cc. de ce liquide, on ajoute 20 cc. de n. NH_4Cl , 12 cc. de n. NH_3 et 1.8 g de SnCl_2 tout en ayant soin de bien mélanger. Après avoir laissé le tout pendant 20 min. à la température ambiante, on centrifuge. Le liquide surnageant qui a un ph. de 6,5-6,3 est décanté, la trypsine est en grande partie adsorbée au précipité $\text{Sn}(\text{OH})_2$. Au précipité lavé, on ajoute 40 cc. d'oxalate ou de citrate d'ammonium à 5% et en mélangeant vigoureusement on ajoute du S.NH_4 incolore jusqu'à élimination complète de l'étain.

Après centrifugation, on décante le liquide surnageant contenant une trypsine fort pure; on rectifie la réaction du liquide et on le dialyse pendant 18-24 h.

On obtient ainsi à peu près 100 cc. d'une trypsine incolore; 1 cc. de ce liquide digère 5 cc. d'une solution à 1% de caséine, jusqu'à 75%, en 1 heure à 37°C, et 1 cc. de ce même liquide ne parvient pas à digérer complètement 2 cc. de 1% d'amidon en 1

heure à 37°C. c'est à dire ne contient qu'une très faible quantité de diastase amylolytique.

3. *Takadiastase purifiée.*

A 200 cc. d'une solution à 1% de takadiastase de la maison Sankyo on ajoute 20 cc. de n. NH_4Cl , 10 cc. de n. NH_3 et SnCl_2 1.8 g., le tout bien mélangé, le ph. du liquide surnageant est de ph. 5,5. La takadiastase est adsorbée par le précipité $\text{Sn}(\text{OH})_2$; après centrifugation et décantage du liquide surnageant le précipité est lavé une fois avec de l'eau; puis, après addition d'oxalate ou de citrate d'ammonium, on ajoute du S.NH_4 incolore jusqu'à élimination de Sn; on centrifuge et on décante le liquide surnageant contenant la plus grande partie de la diastase amylolytique. Le volume du liquide après rectification de la réaction et dialyse pendant 18h.-24h. est de 100-120 cc. il est incolore ou légèrement citrin. Un cc. de cette takadiastase purifiée diluée à 1 : 5000 digère complètement 2.0 cc. d'une solution d'amylum à 1% en 1 heure à 37°C., par contre 1 cc. de cette diastase non diluée ne digère que 5% d'une solution de caséine à 1% en 1 heure à 37°C. C'est donc une diastase amylolytique énergique contaminée seulement avec une très faible quantité de protéase.

MÉTHODE D'EXPÉRIENCE.

Pour reconnaître l'influence de la trypsine et de la takadiastase ainsi purifiée sur la toxine purifiée, on a réparti 2 cc. de toxine dans chacun des flacons, d'un contenu de 15 cc. et pouvant être fermé hermétiquement.

On a ajouté, en plus, dans le premier flacon qui doit servir de contrôle 2.0 cc. d'eau distillée, dans le second 2.0 cc. de trypsine purifiée, dans le troisième 2.0 cc. de takadiastase. Cela fait, on a ajouté à chacun de ces flacons une égale quantité d'une solution de phosphate tampon, de NaCl et de toluène. Après avoir mélangé soigneusement, on a mis ces flacons dans un thermostat pendant un temps déterminé (6 à 20 h.) à 37°C.

En déterminant, après ce laps de temps, le pouvoir toxique de chacun des contenus des flacons, on s'est rendu compte de la perte en toxine éprouvée.

Pour le dosage approximatif du pouvoir toxique, on a injecté sous la peau du cobaye, pesant 250 g., 1,5 cc., dans quelques cas 2.0 cc., du contenu de chaque flacon dilué 5 fois son volume (dans d'autres cas 6 fois) avec de l'eau distillée.

Dans les cas où du sérum normal a été ajouté pour voir s'il y avait inhibition de l'action digestive de la trypsine sur la toxine, 1 cc. de sérum a été employé et le volume total de chaque contenu a été rigoureusement maintenu égal.

On a eu soin de secouer de temps en temps le contenu de chaque flacon pendant le temps d'incubation au thermostat. Dans les expériences d'une durée de 6-8 heures, cette petite opération a été répétée chaque heure, et d'une manière la plus égale possible.

Exp. 1.

Des essais ont été pour examiner l'influence de la trypsine et de la takadiastase sur la toxine et l'inhibition possible en cas de digestion par addition du sérum normal de bœuf ou de l'amylum.

Comme le montre le tableau N° II, le premier flacon reçoit

TABL. N° I.
Purification de la tox. dipht. par $\text{Sn}(\text{OH})_2$

Toxine Dipht.	norm. NH_4Cl	norm. NH_3	SnCl_2 g	Liq. surnageant après centrifugation		Cobaye	Durée de survie
				ph.	Dose injectée pour déterm. la Toxicité		
100 cc.	10 cc.	5.4 cc.	0.9 g	7.7	2/5 cc.	N° 1	+16h
100 cc.	10 cc.	4.5 cc.	0.9 g	7.3	id.	N° 2	+19h
100 cc.	10 cc.	4.2 cc.	0.9 g	6.9	id.	N° 3	+28h
100 cc.	10 cc.	3.8 cc.	0,9 g	6.6	id.	N° 4	+45h
100 cc.	10 cc.	3.5 cc.	0,9 g	6.3	id.	N° 5	Survécu
100 cc.	10 cc.	2.8 cc.	0.9 g	5.6	id.	N° 6	Survécu

TABLE N° II.
37°C. 8 h. Sérum de boeuf.

N° du flacon	Toxine Dipht	10/m Phosph. tampon ph 7,7	Eau Distillée	Solut. de NaCl 0.2%	Sérum de boeuf	Amyl. 5%	Trypsine		Dose injectée	N° du Cobaye	Durée de Survie
							active	inactivée 100°C 2/1h.			
N° 1	2.00	2.00	1.00	4.00	—	—	—	2.00	2/11 × 1.5/6 = 1/22 cc.	N° 48	+ 43h
N° 2	2.00	2.00	2.00	4.00	1.00	—	—	—	1/22 cc.	N° 49	+ 40h
N° 3	2.00	2.00	2.00	4.00	1.00	—	—	—	1/22 cc.	N° 50	+ 38h
N° 4	2.00	2.00	1.00	4.00	—	—	2.00	—	id	N° 51	Survécu
N° 5	2.00	2.00	1.00	4.00	—	—	2.00	—	id	N° 52	Survécu
N° 6	2.00	2.00	—	4.00	1.00	—	2.00	—	id	N° 53	+ 42h
N° 7	2.00	2.00	—	4.00	1.00	—	2.00	—	id	N° 54	+ 41h
N° 8	2.00	2.00	—	4.00	—	1.00	—	2.00	id	N° 55	+ 40h
N° 9	2.00	2.00	—	4.00	—	1.00	2.00	—	id	N° 56	Survécu
		m/10 Phosph. tampon ph 7,0					Takadastase				
							active	inactivée			
N° 10	2.00	2.00	1.00	4.00	—	—	—	2.00	1/22 cc.	N° 60	+ 45h
N° 11	2.00	2.00	2.00	4.00	1.00	—	—	—	1/22 cc.	N° 61	+ 42h
N° 12	2.00	2.00	1.00	4.00	—	—	2.00	—	id	N° 62	+ 45h
N° 13	2.00	2.00	1.00	4.00	—	—	2.00	—	id	N° 63	+ 46h
N° 14	2.00	2.00	—	4.00	—	1.00	2.00	—	id	N° 64	+ 44h
N° 15	2.00	2.00	—	4.00	1.00	—	2.00	—	id	N° 65	+ 42h

Toxine dipht. 2,00+eau dist. 1,00+m/10 Phosph. tampon 2,00 + NaCl 0.2% 4,00+trypsine inactivée 2.00 en tout 11,0 cc. servant de contrôle.

Dans le second et troisième flacon.

Toxine diph. 2,00+eau distillée 2,00+m/10 Phosph. tamp. 2,00 + NaCl 0.2% 4,00+Sérum normal de bœuf 1.00 pour voir si ce sérum est sans action directe sur la toxine.

Dans le 4 ème et 5 ème flacon.

Toxine diph. 2,00+ eau dist. 1.00+m/10 Phosph. tampon 2.00 + NaCl 0.2% 4.00+Trypsine active 2.00 pour constater l'influence de la trypsine sur la toxine.

Dans le 6ème et 7ème flacon. Toxine dipht. 2,00+m/10 Phosph. tamp. 2,00 + NaCl 0,2% 4,00 + Sérum de bœuf norm. 1,00 + Trypsine active 2,00 pour constater l'influence combinée de la trypsine et du sérum sur la toxine.

Dans le 8 ème et 9 ème flacon. Tox. dipht. 2,00+Phosph. tamp. 2,00+0.2% NaCl 4,00+ 5% amyllum 1,00+trypsine active 2,00 (le N° 8 inactivée) pour constater l'influence combinée de la trypsine et de l'amyllum sur la toxine.

Dans le but de constater l'influence de la takadiastase sur la toxine, la toxine et le ferment ont été répartis d'une manière presque analogue à celle de la trypsine comme le montre le tabl. N° II. A chacun des flacons 1.0 cc. de toluène a été ajouté afin d'assurer l'asepsie du contenu et le tout a été mis au thermostat à 37°C pendant 8 heures. Après ce temps écoulé, 1,5 cc. du contenu de chaque flacon dilué 6 fois son volume avec de l'eau distillée a été injecté sous la peau du cobaye pesant 250-260 g.

La durée de survie des animaux a été enregistrée et l'autopsie des animaux morts a été faite chaque fois.

La 10 ème colonne montre la dose de toxine injectée.

Par exemple ici 1,5 cc. de toxine diluée à $2/11 \times 1/6$ c'est à dire $2/11 \times 1,5/6 = 1/22$ cc.

Le résultat de l'expérience est comme le montre la dernière colonne du tabl. II. La toxicité de la toxine du flacon contrôle est

TABL. N° III.
 37° C. 16 h. (Sérum de boeuf.)

N° du flacon	Toxine dipht.	m/10 Phosp. tamp. ph 7.7	H ₂ O	Sérum de boeuf	Sérum chauffé 100° 2/1h	Trypsine		Dose injectée	N° du Cobaye	Durée de Survie
						active 100° C/2h	inact.			
	2.00	2.00	4.00	—	—	—	—	$2/8 \times 1.5/6$ = 1/16	N° 39	+ 40h
	2.00	2.00	1.00	—	1.00	2.00	—	1/16 cc.	N° 40	Survécu
	2.00	2.00	1.00	1.00	—	—	2.00	1/16 cc.	N° 41	+ 36h
	2.00	2.00	1.00	1.00	—	2.00	—	id	N° 42	+ 34h
	2.00	2.00	1.00	1.00	—	2.00	—	id	N° 43	+ 33h
	2.00	2.00	2.00	—	—	2.00	—	id	N° 44	Survécu
		Phosph. tampon ph 7.0				Takadiast				
	2.00	2.00	—	—	—	2.00	—	1/16 cc.	N° 45	+ 36h

démontrée par la mort du cobaye N° 48 en 43 h.

Cette toxicité n'est nullement amoindrie par l'addition du sérum normal de bœuf (mort du cobaye N° 49, 50 en 40-38 h.) mais l'addition d'une trypsine active diminue fortement cette toxicité comme le montre la survie des animaux N° 51, 52.

Cependant l'addition du sérum au mélange toxine + trypsine suffit à protéger la toxine, comme le démontre la mort des animaux N° 53, 54. L'addition d'amidon n'enraye pas la destruction de la toxine.

(Survie du N° 55, 56). Par contre, l'addition de la taka-diastase paraît être sans action sur la toxine, comme le montre la mort des animaux N° 62, 63.

Le tabl. N° III montre une expérience analogue; seulement, le temps d'incubation a été de 16 heures. Le résultat de la digestion a été que, comparé au flacon contrôle N° 1 contenant la toxine + H_2O , celui ayant reçu la toxine + trypsine subit une baisse considérable en toxicité.

Ajouté au complexe toxine + trypsine, le sérum de boeuf a une action inhibitoire sur la trypsine; mais l'amidon n'en possède pas. comme le montre la mort des animaux. La takadiastase est sans action sur la toxine.

Expérience N° 2.

De même que le sérum de boeuf, le sérum normal de lapin enraye l'action destructive de la trypsine sur la toxine comme le montre le tabl. N° IV.

N.B. Le sérum de cheval normal jouit quelquefois d'un pouvoir neutralisant marqué envers la toxine et ne se prête pas à l'examen d'inhibition.

Expérience N° 3.

Il m'a paru utile d'expérimenter l'influence de la température de 37°C sur la toxine purifiée et l'effet de l'addition de sérum ou autre solution protéique dans les mêmes conditions.

Premier essai (Tabl. V A).

Un premier flacon recevant: toxine + eau dist. + solution de

Tabl. N° IV.
Sérum de lapin. 6 h. à 37°C.

N° du flacon	Toxine dipht.	H ₂ O	m/10 phosph. tampon ph. 7.7	Sérum de lapin	Trypsine		Dose inj. 2/7 × 1.5/6	N° du Cobaye	Durée de Survie
					active	inactivée 100°C 1/2h.			
N° 1	2.00	1.00	2.00	—	—	2.00	1/14 cc.	N° 66	+ 29h
N° 2	2.00	2.00	2.00	1.00	—	—	id.	N° 67	+ 25h
N° 3	2.00	2.00	2.00	—	2.00		id.	N 68	Survécu
N° 4	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00		id.	N° 69	+ 27h

NaCl+Phosphate tampon et mis à la placière pendant 6 heures, sert de contrôle. Un second flacon dont le contenu est identique au premier est incubé pendant 6 heures à 37°C.

Un 3ème, 4ème flacon reçoit en plus respectivement 0,5 cc., 0.25 cc. de sérum normal de boeuf. Un 5ème reçoit, au lieu de sérum, 2.00 cc. d'ovalbumine à 1%. On a eu soin de maintenir dans ces 3 derniers flacons la quantité totale, la même que dans le premier flacon. Du toluène a été ajouté pour assurer l'asepsie.

La toxicité du contenu de ces flacons, après 6 heures, a été déterminée par injection d'une même dose sous la peau d'un cobaye du poids de 250 g.

Le résultat a été que la toxicité du flacon contrôle restait la plus haute, celle du flacon mis au thermostat à 37°C était un peu atténuée, celle du flacon auquel du sérum ou de l'ovalbumine avait été ajouté se classant entre ces deux.

Second essai: (Tabl. V B, V C).

Le tabl. V B montre que comparé à la toxine seule mise pendant 6 h. à 37°C, la toxine+trypsine subit une atténuation plus profonde en toxicité.

En somme, il résulte de ces expériences que la trypsine a une action destructive sur la toxine diphtér. purifiée, mais que la taka-diastase ne possède pas cette propriété, que le sérum normal de boeuf ou de lapin ajouté à la toxine, protège celle-ci contre la trypsine.

TABL. V

Temp. de l'essai	Toxine diphth.	H ₂ O	0.5% NaCl	m/10 Phosp. tamp. ph 7.7	Sérum de boeuf. 2 × dilue	Ovalb. 1%		Dose injectée	N° du Cobaye	Durée de Survie	
A											
0°C 6h	2.00	2.00	5.00	2.00	—	—		2/11 × 1.5/ 6.0 = 1/22	N° 70	+ 34h	
37°C 6h	2.00	2.00	5.00	2.00	—	—		1/22	N° 71	+ 43h	
id	2.00	2.00	5.00	2.00	—	—		1/22	N° 72	+ 42h	
id	1.00	2.00	5.00	2.00	1.0	—		id.	N° 73	+ 37h	
id	1.50	2.00	5.00	2.00	0.5	—		id.	N° 74	+ 35h	
id	2.00	2.00	5.00	2.00	—	2.00		id.	N° 75	+ 40h	
B											
						Takadia	Tryps				
37°C 6h	2.00	2.00	5.00	2.00	—	—	—	1/19 ec.	N° 76	+ 44h	
	2.00	2.00	5.00	2.00	—	—	—	id.	N° 77	+ 42h	
	2.00	—	5.00	2.00	—	—	2.00	id.	N° 78	+ 168h	
	2.00	—	5.00	2.00	—	—	2.00	id.	N° 79	Survécu	
	2.00	—	5.00	2.00	—	2.00	—	id.	N° 80	+ 50h	
C											
							Trypsine				
							active	100°c1/2			
0°C 6h	2.00	3.00	3.00	2.00	—	—	—	1/20 ec.	N° 81	+ 33h	
37°C 6h	2.00	3.00	3.00	2.00	—	—	—	id.	N° 82	+ 42h	
id	2.00	3.00	8.00	2.00	—	—	—	id.	N° 83	+ 44h	
id	2.00	1.00	3.00	5.00	—	—	2.00	id.	N° 84	+ 40h	
id	2.00	1.00	3.00	2.00	—	—	2.00	id.	N° 85	Survécu	
id	2.00	1.00	3.00	2.00	—	—	2.00	id.	N° 86	Survécu	

On doit aussi retenir que la toxine purifiée semble être assez labile, puisque, mise pendant 6 heures à 37°C, elle subit une baisse assez marquée en toxicité, par rapport à celle mise pendant ce temps à la glacière; l'addition de sérum ou d'ovalbumine atténue cette baisse. La température de 37°C occasionne donc une baisse en toxicité, la trypsine ajoutée augmente cette baisse; mais, même dans ce cas, l'addition de sérum enrayer la destruction de la toxine.

En résumé :

1. L'emploi du ZnCl_2 dans les méthodes de Brieger, de Hosoya pour purifier la toxine diphtérique, resté inexpliqué, a pour but la formation de corps adsorbant sélectivement la toxine, tel que le phosphate de zinc ou l'hydroxyde de zinc résultant de la combinaison du ZnCl_2 avec les phosphates et l'ammoniaque contenus dans la toxine mère. C'est un mécanisme d'adsorption comme le comprenait Willstätter dans sa méthode d'adsorption et d'élution pour la purification des ferments.

2. Les phosphates de Ca, Sr, Ba (ph 6,0-6,8)

L'hydroxyde d'étain (ph 5,8-6,6)

Sont aussi de bons adsorbants de toxine.

3. Dans la seconde partie de la purification correspondant à une élution, la formation d'un sulfure métallique approprié en réaction alcaline favorise l'élimination du reste des corps à réaction du biuret contaminant la toxine. Le sulfure de manganèse et celui d'étain jouissent de la même propriété que la ZnS .

4. J'ai décrit une méthode de purification par la méthode d'adsorption au $\text{Sn}(\text{OH})_2$. La toxine purifiée obtenue, d'une toxicité 2 fois plus grande que la toxine mère, ne possède ni les réactions des protéines ni celles de sucre.

5. La trypsine et la takadiastase ont été purifiées avec la méthode d'adsorption au $\text{Sn}(\text{OH})_2$.

6. En faisant agir la trypsine ou la takadiastase purifiée sur la toxine, on observe que la trypsine jouit d'une influence destructive sur la toxine, mais que la takadiastase est sans action sur elle. L'addition de sérum inhibe l'action nocive de la trypsine.

7. La toxine purifiée se montre déjà un peu labile contre une légère élévation de la température; dans ce cas aussi, l'addition de sérum ou d'ovalbumine protège la toxine dans une certaine mesure.

CONCLUSION.

L'emploi du ZnCl_2 pour la purification de la toxine avait pour but la formation de corps tel que le $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ou le phosphate de Zinc, corps doué d'une forte action adsorbante envers la toxine. C'est donc la méthode d'adsorption et d'élution de Willstätter employée par cet auteur à purifier les ferments, qui est appliquée ici à la purification de la toxine.

L'analogie se retrouve en dehors du Zinc avec d'autres métaux. Avec d'autres phosphates: les phosphates de Ca, Sr, Ba; Avec d'autres hydroxydes: l'hydroxyde d'étain, tous excellents adsorbants de la toxine.

Une toxine purifiée par les méthodes décrites antérieurement, bien que d'une concentration en toxine supérieure à la toxine mère, n'a point les réactions de protéine ni celles de sucre.

Il serait téméraire cependant, vu la grande toxicité de la toxine, de conclure de là que la toxine n'est pas de nature protéique.

Des expériences faites avec la toxine diphtérique purifiée et des ferments purifiés, ont montré que la trypsine avait une action nocive sur la toxine, mais que la takadiastase semblait indifférente envers celle-ci.

Il serait donc plus rationnel de penser que la constitution de la toxine a un rapport étroit avec les protéines ou bien qu'une minime quantité de matières protéiques est nécessaire au maintien de la stabilité d'une toxine diphtérique.

J'exprime ici ma sincère reconnaissance aux Professeurs S. Kakiuchi et T. Kohmoto pour la bienveillance qu'ils m'ont témoignée et pour les bons conseils qu'ils m'ont donnés au cours de ce travail.

*Mémoire présenté à la séance du 21 Juin 1930
de la Société de Biochimie du Japon.*

BIBLIOGRAPHIE.

- L. Brieger. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 783, 3 Déc. 1896.
S. Hosoya. Comptes rendus des séances de la Soc. de biol. 99, 1297.
1928.

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER BLATTPRESSSÄFTE UND BLATTFARBSTOFFE.

VON

H. HÔDYÔ.

*(Aus dem rechtsmedizinischen Institut der medizinischen Fakultät zu
Nagasaki Japan. Vorstand: Prof. Dr. H. Asada)*

(Eingegangen am 5 Dezember 1930)

Schon zu Anfang des 20. Jahrhunderts wurde eine Klassifikation der Pflanzen mittels biologischen Verfahrens von manchen Botanikern vorgenommen, von denen wir nur Kowarski (1901), Schütze (1902), Magnus (1907), Wendelstand (1911), Fellmer (1911), Gohlke (1913), Tüni u. Thaysen (1914) nennen. Zuerst haben diese Autoren die Präzipitin- und Konglutininreaktion zur Pflanzendifferenzierung als wichtige Untersuchungsmethode gefunden; später bedienten sie sich nicht nur dieser oder der Komplementbindungsmethode, sondern führten auch die anaphylaktische Reaktion durch. Der letzteren wiesen sie eine bemerkenswerte Spezifität und Überlegenheit über die anderen biologischen Reaktionen nach. Dabei immunisierten sie aber das Tier nur mit der Impfungsmethode. In letzter Zeit ist die Frage der Schutzwirkung der tierischen Haut, vor allem vom immunologischen Gesichtspunkt aus, wieder Gegenstand eifriger Bearbeitung geworden, weil schon vor mehr als 20 Jahren viele Autoren bestätigten, dass die Haut für Bakterien oder tierisches Eiweiss passierbar sei, und so bei einem Tier Antikörperproduktion verursachen könne. Diese Tatsache wurde durch die Arbeiten von Hoffmann (1903), Kasten (1903), Wassermann (1911), Mallory u. Marble (1925), Besredka (1926), Kurokawa (1926), Fuji (1927), Hanaoka (1928) und Sato (1930) nachgewiesen. Die Fortschritte der Botanik in dieser Arbeitsrichtung

sind aber viel geringer als die der Zoologie. Was die Pflanzenbaustoffe wie Chlorophyll anbetrifft, so finden sich darüber in der Literatur keine hierher gehörigen Experimente. Neuerdings gelang es nun Mitarbeitern von Prof. Mita, Antikörper gegen Hämoglobin durch cutane Immunisierung zu erhalten. Bei dem Chlorophyll, welches dem Hämoglobin sehr nahe verwandt ist, könnte man sicher auch mit cutaner Immunisierung positive Resultate erwarten. Diese Überlegung war das Motiv zu dieser Arbeit über Blattpresssäfte und Blattfarbstoffe.

HERSTELLUNGSMETHODE DER ANTIGENE.

Antigene Materialien sind Rapsblatt, Rettichblatt, Lattichblatt, Kohlblatt, Spinatblatt u. a m. Zunächst presst man die frischen, wiederholt gewaschenen, zerkleinerten Materialblätter durch die Pressmaschine aus, filtriert die Presssäfte durch 2-3 Stücke Gaze oder zentrifugiert sie, wenn nötig; dann erhält man eine relativ klare, rohe, grüne Flüssigkeit: die Blattpresssäfte. Sodann verarbeitet man zur Darstellung des reinen Chlorophylls nach Willstätter eine bestimmte Menge von gewaschenen frischen Blättern rasch mit dem Steinmörser zu dünnem Brei und vorextrahiert durch Schütteln mit einer grossen Menge von wasserfreiem Aceton in einer Flasche; durch Absaugen und starkes Abpressen entfernt man den Vorextrakt. Nun extrahiert man mit derselben Menge von reinem Aceton den gemahlenen Presskuchen. Durch Absaugen und Nachwaschen mit 80%igem Aceton gewinnt man einen schwarzgrünen Extrakt, den man unter Umschwenken in Petroläther einlaufen lässt, wobei sich zwei Schichten scharf voneinander trennen, und die unten liegende Acetonlösung allmählich entfärbt wird. Zum Auswaschen der Verunreinigungen wird dem Petroläther 80%iges Aceton zugefügt, dessen grösserer Teil nachher mit Wasser zweimal frei gewaschen wird. Zur Entfernung des Xanthophylls genügt hauptsächlich zweimaliges Waschen mit 80%igem Holzgeist, welcher nach etwa fünfmaligem Nachwaschen mit Wasser wieder aus der Lösung verschwindet. Den inzwischen

schwarz flockig gewordenen Chlorophyllrückstand sammelt man auf mit Talk belegtem Filterpapier durch schubweisen Zusatz von Petroläther, löst die Chlorophyllflocken auf und lässt sie durch die Talkschiicht filtrieren, um reines Chlorophyll als Ausbeute zu erhalten.

REAKTIONSMETHODE.

In meiner Arbeit ist hauptsächlich die Präzipitation angewandt worden. Eine Ringbildung wurde zweimal, und zwar nach 30 Minuten und nach 1 Stunde abgelesen. Aber da die Reaktion gegen Lipoidverbindungen, wie Chlorophyll, sehr schwer erfolgt, untersuchte ich nicht nur durch Präzipitation, sondern auch durch Ausflockungsreaktion oder Komplementbindungsreaktion. Wenn man die Ausflockung prüfen will, darf man nach Durchschütteln der Reagenzien (Antigen und Antikörper) erst nach 10 bis 24 stündigem Aufenthalt im Brutschrank die Reaktion ablesen. In diesem Falle benutzt man als Antigen die Blattpressäfte oder die Emulsion des petrolätherischen Chlorophylls in der physiologischen Kochsalzlösung. Zu der Präzipitation benutzt man gewöhnlich die in physiologischen Kochsalzlösungen in verschiedener Weise verdünnten Blattpressäfte. In jedem Fall wurde die Methode in normaler Weise angewandt, und immer wurden Versuchskontrollen vorgenommen. Nun muss aber hier noch Einiges über Pressäfte erwähnt werden. Wenn man 20 Gramm Blätter nimmt und diese mit der Pressmaschine behandelt, so erhält man gewöhnlich die Pressäfte wie folgt:—mindestens 12.0–13.0 ccm; falls man eine grosse Menge bekommt 15.0–16.0 ccm; durchschnittlich 14.0 ccm. Deshalb hält man Mass bei der Regulierung der Presse und erstrebt gewöhnlich nur die Gewinnung einer durchschnittlichen Menge.

IMMUNISIERUNG.

Als besonders günstige Versuchstiere erwiesen sich nach Sato (1930) Meerschweinchen. Ich benutzte daneben auch Kaninchen. Die antigene Substanz, Blattpressäfte oder Blattfarbstoffe, wurde

zunächst mit Lanolin gemischt und täglich einmal auf Rücken- oder Bauchhaut der Versuchstiere aufgeschmiert; dabei schor man die Haare ab, ohne zu rasieren, um locale Schädigungen zu vermeiden; auf die Lanolinsalbe legte man einen Verband. Man wechselte täglich nicht nur die Salbe und den Verband, sondern auch den Applikationsort, da alle Schleimhäute und Häute das sogenannte "Nare"-Phänomen von Prof. Mita oder "Refraktärwerden" zeigen können. Bei den Kontrollversuchen wurde täglich nur reine Lanolinsalbe aufgeschmiert und der Verband angelegt. Nach durchgeführter Immunisierung prüfte man den Titer des Antikörpers, und die Tiere wurden in einem geeigneten Zeitpunkt durch Aderlass getötet. In einer dritten Versuchsreihe immunisierte man die Tiere mit denselben Materialien per Os, und in einer vierten intravenös oder intraperitoneal, wobei die Einspritzung einer grossen Masse in die Bauchhöhle vermieden werden musste, weil die schleimhaltige Blattsubstanz nach der Verabreichung oft wochenlang in der Peritonealhöhle als solides Depot ohne Resorption liegen blieb. Die Injektion wurde alle 3 Tage 3 mal wiederholt, und wie gewöhnlich wurden Sera entnommen.

Immunisierungsprotokolle.

Meerschweinchen.

Nr.	Körpergewicht. (Gr.)	
1.	320.	Rapsblattpressäfte aufgeschmiert. 14/VIII—30/VIII 1929. 5/IX getötet.
2.	300.	
3.	360.	
4.	300. (gestorben)	
5.	390.	
6.	300.	
7.	345.	
8.	260.	
9.	315.	
10.	310. (gestorben)	
11.	330. (gestorben)	
12.	280. (gestorben)	
13.	325.	
14.	420. (gestorben)	

15.	320.	}	Rapsblattpressäfte aufgeschmiert. 14/VIII—10/IX 1929. 18/IX getötet.
16.	350. (gestorben)		
17.	330. (gestorben)		
18.	335.		
19.	320.		
20.	310.		

Meerschweinchen.

Nr.	Körpergewicht. (Gr.)		
21.	390. (gestorben)	}	Rettichblattpressäfte aufgeschmiert. 14/VIII—30/VIII 1929. 6/IX getötet.
22.	320. (gestorben)		
23.	340.		
24.	325.		
25.	375.		
26.	440.		
27.	320.		
28.	270.		
29.	280 (gestorben)		
30.	395.		
31.	340. (gestorben)	}	Rettichblattpressäfte aufgeschmiert. 14/VIII—11/IX 1929. 18/IX getötet.
32.	350.		
33.	228.		
34.	340.		
35.	360. (gestorben)		
36.	350. (gestorben)		
37.	360. (gestorben)		
38.	300.		
39.	380.		
40.	310.		

Meerschweinchen.

Nr.	Körpergewicht. (Gr.)		
41.	500.	}	Durch Tôfukara (Bohnenpressrückstand) mit Rapsblatt ernährt. (Kontrollversuch.) 14/VIII—30/VIII 1929.
42.	410.		
43.	330.		
44.	380.	}	Durch Tôfukara (Bohnenpressrückstand) mit Rettichblatt ernährt. (Kontrollversuch.) 14/VIII—30/VIII 1929. 6/IX getötet.
45.	325.		
46.	420.		

Kaninchen.

Nr.	Körpergewicht. (Gr.)	
50.	2200.	}
51.	2150.	
52.	1600. (gestorben)	
53.	2300.	

54.	2030. (gestorben)	}	Spinatblatt aufgeschmiert. 3/II—18/II 1930. 26/II getötet.
55.	1800. (gestorben)		
56.	2200.		
57.	1750.		
58.	1900. (gestorben)		
59.	1600.		
60.	1550.		

Kaninchen.

Nr.	Körpergewicht. (Gr.)	}	Durch Tôfukara mit Spinatblatt ernährt. 3/II—18/II 28/II getötet.
61.	1650.		
62.	1800.		
63.	2050.		

Kaninchen.

Nr.	Körpergewicht. (Gr.)	}	Rapsblattpresssäte intravenös od. intraperitoneal injiziert. 9/V 13/V 17/V 1930. 24/V getötet.
70.	1550. (gestorben)		
71.	1700.		
72.	1480.		
73.	2000. (gestorben)	}	Spinatblatt aufgeschmiert. 9/V—18/V 1930. 25/V getötet.
74.	1930.		
75.	1750.		
76.	1700.		
77.	2500.		
78.	1800. (gestorben)		
79.	1950. (gestorben)		

Kaninchen.

Nr.	Körpergewicht.	}	Spinatblattchlorophyllemulsion subcutan injiziert. 9/V 12/V 16/V 19/V 26/V getötet.
80.	2200.		
81.	1500.		
82.	1750.	}	Spinatblattchlorophyllemulsion intraperitoneal injiziert. 9/V 12/V 16/V 19/V 26/V getötet.
83.	1700. (gestorben)		
84.	1800.		
85.	1600.	}	Spinatblattchlorophyll mit Schweineserum intravenös injiziert. 9/V 12/V 16/V 19/V 27/V getötet.
86.	1650. (gestorben)		
87.	1850.		
88.	1500. (gestorben)		
89.	1550. (gestorben)		
90.	1700.		

TABELLE I.

Präzipitation.		
Nr. der Antikörper.	Verdünnung der Rapspressäfte	Kontrolle (normale Sera)
	1 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048	
5		—
19		—
18		—
8		—
1		—
15		—
9		—
20		—
7		—
2		—
3		—
6		—
13		—

Verdünnung der Rettichpressäfte

Nr. der Antikörper.	Verdünnung der Rettichpressäfte	Kontrolle (normale Sera)
	1 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048	
5		—
19		—
18		—
8		—
1		—
15		—
9		—
20		—
7		—
2		—
3		—
6		—
13		—

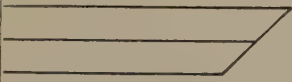
TABELLE III.

Präzipitation.										
Nr. der Antikörper	Verdünnung der Antigene. (Raps- od Rettichblattpressäfte.									
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	Kontrolle (normale Sera)
41										—
42										—
43										—
44										—
45										—
46										—

(Raps-, Spinat- od. Rettichblattpressäfte.)

61	negativ	—
62	„	—
63	„	—

(Spinatblattpressäfte.)

75		—
77		—
76		—

(Rapsblattpressäfte.)


75		—
77		—
76		—

TABLE IV.

Ausflockung.											
(Antigene Spinatblattpressäfte wurde 1/20 verdünnt.)											
Nr. der Antikörper	Verdünnung der Antikörper.										Kontrolle
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
50											—
57											—
59											—
51											—
53											—
56											—
60											—

Komplementbindung.

(Spinatblattechlorophyllemulsion wird als Antigen benutzt)

Nr. der Antikörper	Resultat.		Kontrolle
	komplette	Hämolyse	
50			ohne Störung.
57	—	—	—
59	—	—	—
51	—	—	—
53	—	—	—
56	—	—	—
60	—	—	—

Ausflockung.

Kaninchen.	Verdünnung der Antigene.									Kontrolle			
	2	4	8	16	32	64	128	256	512		1024	2048	4096
Nr. 71. + Rapsblattpressäfte.													—
71. + Rettichblattpressäfte.													—
71. + Kohlblattpressäfte.													—
71. + Fudansoblattpressäfte.													—
71. + Spinatblattpressäfte.													—
71. + Lattichblattpressäfte.													—
Nr. 72. + Rapsblattpressäfte.													—
72. + Rettichblattpressäfte.													—
72. + Kohlblattpressäfte.													—
72. + Fudansoblattpressäfte.													—
72. + Spinatblattpressäfte.													—
72. + Lattichblattpressäfte.													—
Nr. 74. + Rapsblattpressäfte.													—
74. + Rettichblattpressäfte.													—
74. + Kohlblattpressäfte.													—
74. + Fudansoblattpressäfte.													—
74. + Spinatblattpressäfte.													—
74. + Lattichblattpressäfte.													—

TABELLE VI.

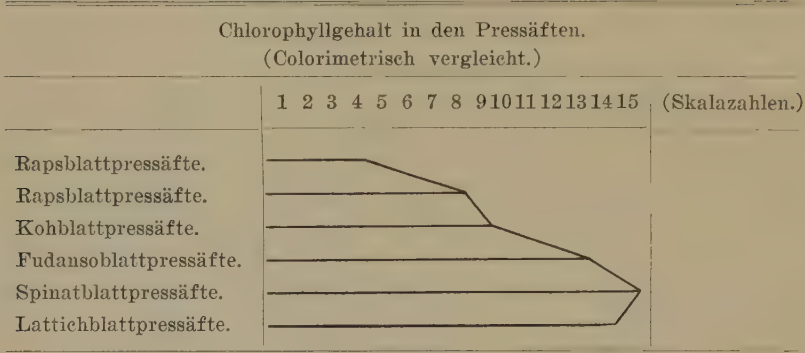
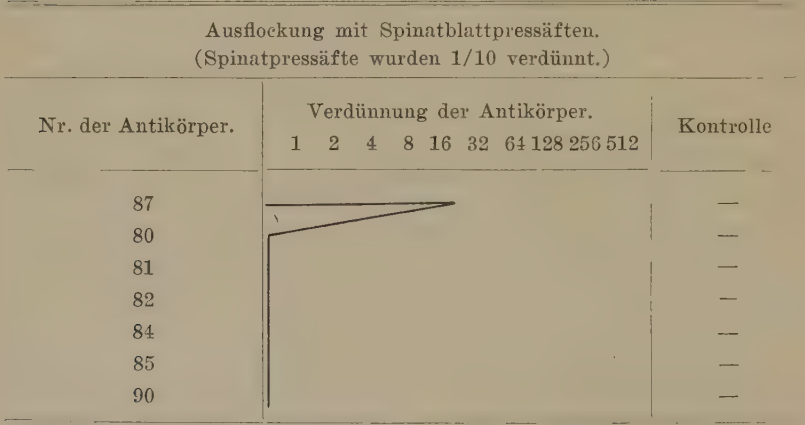


TABELLE VII.



Ausflockung mit der Chlorophyllemulsion
von Spinatblatt.

87	unklar	unklar
80	"	"
81	"	"
82	"	"
84	"	"
85	"	"
90	"	"

Komplementbindung mit Chlorophyllemulsion
von Spinatblatt.

	unklar	ohne Störung
87		
80	„	„
81	„	„
82	„	„
84	„	„
85	„	„
90	„	„

RESULTATE.

Einige Versuchstiere zeigten keine Antikörperbildung, andere aber produzierten relativ starke, spezifische Antikörper. Besonders auffällig ist es, dass man durch die cutane Immunisierung mit pflanzlichen Pressäften den Versuchstieren Eigenschaften verliehen kann, durch die der Unterschied zwischen nahe verwandten Pflanzen klar zu machen ist. Die normalen Meerschweinchensera oder Kaninchensera bildeten keine Präzipitate mit den pflanzlichen Pressäften, und auch die Sera von per Os immunisierten Tieren reagierten nicht mit den Pressäften. Die durch cutane Immunisierung hergestellten Antikörper zeigten dagegen eine starke Differenzierungskraft, durch welche der Rettich sich klar vom Raps, und auch vom Lattich unterscheiden liess. Man kann ebenfalls Spinatblatt von Raps, Rettich oder Lattich leicht unterscheiden, und es wird sogar eine Art von Raps von den anderen Arten Raps fast differenziert. Die Verwandtschaftsgrade unter diesen Blättern konnten auch genau festgestellt werden. So hat z. B. eine Art von Raps eine sehr nahe Verwandtschaft mit dem Rettich, und in folgender Reihe sind nahe miteinander verwandt: Kohl, Spinat und Lattich. Die Feststellung ist vermutlich deswegen möglich, weil die Schutzwirkung der Haut spezifisch sehr stark differenziert ist. Die durch cutane Immunisierung erhaltenen Antikörper zeigten nun zwar solche Differenzierungskraft, aber

die Titer der Antikörper waren gewöhnlich niedriger als die der durch die Impfungsmethode erhaltenen Antikörper.

An zweiter Stelle nahm ich dann andere Experimente vor, die Antikörperexistenz des Chlorophylls nachweisen sollten. Um hierüber genau zu berichten, möchte ich hier nochmals kurz daran erinnern, dass das Chlorophyll eine mit dem Hämoglobin sehr nahe verwandte Substanz ist. (Verdeil 1851). In dieser Hinsicht haben Forscher wie Hoppe-Seyler (1879-1881), Tschirch (1879), Hartley (1891), Schunk (1895-1909), Willstätter (1911), und Asahina (1911) durch stetige und mühsame Arbeit endlich den chemischen Zusammenhang klar gemacht. Wenn man nämlich Athiophyllin einerseits und Hämin andererseits respektive zerlegt, so erhält man vom ersteren Phylloporphyllin, vom letzteren Hämatoporphyrin, welche sich beide übereinstimmend durch Auflösung zu Hämopyrol zersetzen. Obgleich seit der Entdeckung des Chlorophylls durch Berzelius (1838) unsere Anschauungen über seine Natur hauptsächlich hinsichtlich seiner Chemie allmählich erweitert worden sind, ist es doch noch eine viel umstrittene Frage, ob das Chlorophyll je nach den Pflanzenarten verschieden ist. Fremy fand im Jahre 1860, dass das Chlorophyll ein Gemisch von Phylloxanthin und Phyllocyanin ist, und Hansen (1889) führte aus, dass das sogenannte Chlorophyll nicht ein Farbstoff sei, sondern ein Gemenge von zwei durch Fettsäuren verbundenen Farbstoffen. Gautier (1895) und Etard (1906) legten nur ihre Ansichten dar, Kraus (1872), Marchlewski (1896), Willstätter und Stoll (1913) begründeten aber durch chemische Experimente die Meinung, dass reines Chlorophyll eine einzige Art ist. Also musste in diesen Experimenten reines Chlorophyll als Reagenzantigen benutzt werden. Rein dargestelltes Chlorophyll ist zwar in Aceton, Äther oder Alkohol leicht löslich, in Wasser sowie auch in physiologischer Kochsalzlösung aber absolut unlöslich. Dementsprechend wurde hier Chlorophyllemulsion angewandt. Andererseits aber verhinderten die Chlorophylllösungsmittel die Reaktion der Präzipitation, denn sie selbst zeigen auch eine leichte Trübung,

wenn sie mit den normalen Seren in Kontakt gebracht worden sind. Deswegen wollte es nicht gelingen, die Präzipitation sicher nachzuweisen. Ich prüfte dann weiter die Antikörperbildung gegen reines Chlorophyll. Reines Chlorophyll (oder dieses mit Schweineserum gemischt) wurde injiziert; manchmal schmierte ich auch das mit Lanolin gemischte Chlorophyll auf und untersuchte die Reaktion zwischen den Immunsera und den Blattpressäften, in welchen selbstverständlich Chlorophyll reichlich vorhanden ist. Aus den Experimenten ging klar hervor, dass der Antikörper gegen reines Chlorophyll schwer zu gewinnen ist, weil ich nur in einem Falle einen schwachen Antikörper bekommen konnte, in allen anderen Fällen dagegen eine Antikörperbildung kaum beobachtet wurde. Alle anderen Reaktionsgrade zwischen den Antigenen und Antikörpern haben nichts zu tun mit dem Chlorophyllgehalt, sie hatten vielmehr umgekehrte Beziehungen, wie man es in Tabelle 5 und 6 sieht. Die Spezifität, die der durch cutane Immunisierung von Blattpressäften erhaltene Antikörper zeigt, scheint mir also nicht auf der Antikörperexistenz des Chlorophylls zu beruhen, sondern auf anderen Ursachen; z. B. können wir den Ursprung der Spezifität so vermuten, dass die Mengenverhältnisse von Eiweiss, Fette, Lipoiden, Stärke, Inulin, Glukosiden, Alkaloiden, organischen und anorganischen Säuren und Salzen verschieden sind. Gelegentlich hat man als Reaktionsantigen in vitro nicht nur reines Chlorophyll, sondern auch Chlorophyll-a und Chlorophyll-b, Xanthophyll und Carotin benutzt, aber der Antikörper gegen diese Substanzen wurde nicht bewiesen. Weder durch Präzipitation, noch durch Ausflockung und Komplementbindung lässt sich also nachweisen, ob reines Chlorophyll eine einzige Art ist oder nicht. Edward Jena hat im Jahre 1928 über die chemische Schutzwirkung der Haut berichtet, und aus seinen Experimenten geht hervor, dass in der Haut und in dem von der Haut gebildeten verhornten Deckepithel chemisch isolierbare Substanzen vorhanden sind, die bei ihrer Wiedereinverleibung Tieren die Fähigkeit verleihen, oft mehrfach tödliche Dosen von Giften verschiedenster

Art zu vertragen, ferner die Produktion und zeitliche Wirksamkeit der Fermente zu erhöhen. Ich konnte die Antikörperbildung des Chlorophylls nicht klar nachweisen, aber ich konnte die Wirkung auf die Haut feststellen, und ich möchte auf Grund meiner Arbeit behaupten, dass die Haut immer tätig ist, den Organismus gegen alle Schädigungen in Schutz zu nehmen, sodass, wenn immer eine dem Tiere artfremde Substanz in Berührung mit der nackten Haut kommt, in dem Kreislaufe der Haut gegen die betreffende Substanz sich ein streng spezifischer Schutzkörper (Antikörper) bilden kann. Dieser biologische Vorgang wurde in meiner Arbeit durch die Andendung der Pflanzenmaterialien sicher nachgewiesen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN.

Durch cutane Immunisierung erhält man relativ starke spezifische Immunkörper. Sehr nahe verwandte Blattarten können durch Anwendung dieser Methode scharf voreinander unterschieden werden. Ob aber der Antikörper gegen das Chlorophyll dabei eine grosse Rolle spielt, konnte ich leider nicht feststellen. Die Ursache dafür, dass der Antikörper des Hämoglobins durch cutane Immunisierung relativ leicht, der Antikörper des dem Hämoglobin chemisch sehr nahe verwandten Chlorophylls aber sehr schwer zu erhalten ist, scheint mir darin zu liegen, dass Hämoglobin leicht in Wasser löslich ist, Chlorophyll aber keine Wasserlöslichkeit hat. Schliesslich möchte ich betonen, dass die Haut als Schutzorgan in innigem Zusammenhang mit den übrigen Organen steht, die den Organismus biologisch vollkommen und gefahrlos funktionieren lassen.

Den Herren Professoren Mita und Asada bin ich für ihre unermüdliche Anleitung zu grösstem Danke verpflichtet.

LITERATURE

- Etard (1906): La biochimie et les chlorophylles.
 Fuji (1927): Abdruck von Ikai Jiho Nr. 1735.
 Gohlke (1913): Die Brauchbarkeit der Serumdiagnostik für den Nach-
 weiss zweifelhafter Verwandtschaftreaktion im Pflanzenreich.
 Hanaoka (1928): Shakai-Igoku-Zassi. Nr. 498.
 Hansen (1889): Farbstoff des Chlorophylls.
 Jena (1928): Ergebnisse der Hygiene. Bd. 9.
 Kraus (1872) Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe.
 Marchlewski (1895): Die Chemie des Chlorophylls.
 Sato (1930): Shakai-Igaku-Zassi., Nr. 520.
 Schunk (1909): Die Chemie der Chlorophylle.
 Tschirch (1884): Untersuchungen über das Chlorophyll.
 Willstätter u. Stoll (1913): Untersuchungen über das Chlorophyll.
 Willstätter (1924): Die Blattfarbstoffe.

Folgende Autoren und ihre Arbeiten wurden in der oben erwähnten
 Literatur zitiert:

Asahina, Becker, Bertarelli, Bezelius, Besredka, Fremys, Gais,
 Gautier, Hartley, Hoffmann, Hoppe-Seyler, Hansen Kowarski,
 Kurokawa, Magnus, Mallory & Marble, Miller, Mita, Nencki,
 Schütze, Tönig. Thaysen, Uhlenhuth, Jung, Verdeil, Wasser-
 mann, Wendelstandu. Fellmer.

A COLD-HEMOTOXIN, NEWLY DISCOVERED IN HEATED SERUM.

Part I.

The Existence of a Cold-Hemotoxin in Heated Immune Serum

By

KATSUO TOSHIMA.

*(From the Forensic Medical Laboratory of Prof. Dr. K. Yamakami,
Medical Department of the Hokkaido Imperial University,
Sapporo, Japan.)*

(Received for publication, January 10, 1931)

I. INTRODUCTION.

The serological substances react for the most part only at the temperatures near 37°C , or at least they react better at this temperature than at a lower one. Thus many serological reactions do not take place at 0°C .

Such is also the case with hemolysis caused by various kinds of serum-hemolysins and hemotoxins.

It is well known that the serum-hemolysin (amboceptor) can be combined by the erythrocytes even at 0°C , but the corresponding hemolytic complement of serum does not react at low temperatures.

On the other hand, however, we know already some serological substances which react only at low temperatures.

The so-called iso-auto-cold hemolysin which has been discovered by Donath and Landsteiner in the serum of patients of paroxysmal hemoglobinuria, is a well known example of such serological substances.

In this case, the cold hemolysin does not combine with erythrocytes at 37°C ; the reaction between cold hemolysin and erythrocytes takes place only at temperature near 0°C , though the reaction between the complement and the sensitized erythrocytes,

and consequently the hemolysis occurs only at temperature near 37°C .

Various kinds of hemoagglutinins belong also to the serological substances which react better at lower temperatures than at higher, as Landsteiner and his collaborators could demonstrate.

Among hemoagglutinins, the cold autoagglutinin which exists in the serum of almost all sorts of warm-blooded animals and which agglutinates its own erythrocytes only at temperatures lower than 15°C , is most familiar to us, in this respect.

It has also been proved in our laboratory by T. Kubo (1927) that the hemoagglutinin in the lens reacts only at temperature lower than 20°C (generally at $0-10^{\circ}\text{C}$) and also by T. Mitsui (1928) that the hemoagglutinin extracted from erythrocytes (intracellular hemoagglutinin) can agglutinate erythrocytes only at temperatures below 33°C .

In the present work, I am going to add another very interesting example of the serological substances reacting only at low temperatures, which we have newly discovered by chance in heated serum.

This substance is neither hemoagglutinin nor serum-hemolysin in the usual sense, and is to be classified as a hemotoxin, because it causes hemolysis when added to erythrocytes, but it does not require the hemolytic complement in producing hemolysis as general serum-hemolysins do.

The most striking character of this substance is that it reacts with erythrocytes only at very low temperatures ($0-5^{\circ}\text{C}$) as will be described later again in detail in the experiment.

II. THE COURSE OF EXPERIMENTS IN WHICH THE COLD-HEMOTOXIN WAS FIRST DISCOVERED.

Our first discovery of the cold-hemotoxin was made by chance in the course of an investigation upon the hemoagglutinoïd.

It is a well settled fact that the immune serum containing various kinds of bacteria-agglutinin when heated so that its

agglutinating power has been destroyed, manifests a marked power of inhibiting the agglutination of bacteria by the unheated active agglutinin-serum.

This property of the heated agglutinin-serum is generally attributed to the existence of so-called agglutinoid, which, formerly has been supposed by many investigators to have been produced, or to say in better words, modified from agglutinin by heating.

Now we have been working on the problem, whether an analogous power of inhibiting agglutination can be demonstrated in the heated serum containing immune hemoagglutinins.

For this purpose, rabbits were injected with erythrocytes of chickens, men, etc., and then, the immune hemoagglutinin-serum prepared in this way was heated at various temperatures, after having been suitably diluted with saline solution in order to prevent the heat-coagulation of serum protein, and thus the agglutinating power was entirely destroyed.

The immune hemoagglutinin-serum thus treated can sensitize the erythrocytes or, in other words, the agglutinability of erythrocytes by the immune hemoagglutinin is cancelled entirely or partly when the erythrocytes have been digested previously with the heated serum.

So far, nothing interesting.

But, when we stored the erythrocytes suspended in the heated immune serum in the ice-room over night for the purpose of sufficiently sensitizing the erythrocytes with agglutinoid, we very often found, to our disappointment, that the erythrocytes were for the greater part hemolysed, so that we could not obtain a sufficient amount of the sensitized erythrocytes.

Though the immune hemoagglutinin-serum obviously contains immune hemolysin beside the agglutinin, the hemolysis above mentioned can not be attributed to the effect of hemolysin in the general sense, because the serum has always been heated at temperatures higher than 56°C and, consequently, not only the hemolytic complement must have been completely inactivated but also even the

hemolysin itself must have been partly destroyed.

The hemolysis did not occur if the erythrocytes in the heated serum was placed at room temperature. The hemolysis by the heated serum must, therefore, be attributed to some peculiar hemolytic agent which reacts with erythrocytes only at low temperatures and causes hemolysis without the aid of a complement.

So far as we know, literature does not furnish any example of such a kind of hemolytic agent. We, therefore, thought it very interesting and worth while to investigate this hemolysis in detail.

The brief outline of the results obtained in the experiments made for this purpose, by employing the heated immune serum, will be described below.

III. MATERIALS.

Rabbits were injected with the erythrocytes of man, chicken, cattle, guinea-pig etc.. The blood to be injected was obtained on the day of injection, employing a small quantity of 10% sodium citrate solution as anti-coagulant. The blood-corpuscles were washed several times with the physiological saline solution. 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 cc. of the washed erythrocytes were injected at intervals of 3-4 days into the ear veins of healthy rabbits.

Before each injection, the blood was taken from the ear vein at the hungry hour of the animals, and the serum separated from this blood was employed as experimental material.

EXPERIMENTAL RESULT.

I. Relationship between the strength of cold hemolysis and the degree of heating temperature.

In the first experiment, the relationship between the degree of temperature at which the immune sera have been heated, and the strength of the cold-hemolytic agent in the heated serum was investigated.

For this purpose, various immune sera prepared in the way

described in the previous chapter were heated at 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C etc. for 30 minutes, after having been previously diluted with suitable amounts of physiological saline solution in order to prevent the heat coagulation of serum protein.

The heat-coagulation of the rabbits' immune sera could generally be avoided by diluting the sera at the following ratio:

Dilution to 1/10 with NaCl solution when the serum is to be heated at 85° or 90°C for 30 minutes,

Dilution to $\frac{1}{4}$ when the serum is to be heated at 70–75°C,

Dilution to $\frac{1}{2}$ when it is to be heated at 60–65°C.

From the immune sera, thus heated, 0.9 cc. was taken in each of three tubes, and 2 drops of 5% emulsion of the corresponding erythrocytes were added to each tube. For instance, when the immune serum of rabbits injected with human erythrocytes was employed, the emulsion of human erythrocytes was added. The tubes were left for six hours at room temperature, in the ice box, or in the incubator at 37°C respectively.

As control, the erythrocytes suspended in the physiological saline solution were placed at the same temperatures for the same length of time.

The degree of hemolysis in each tube was examined at the end of 6 hours.

The results are shown in tables I and II.

As will be seen in the tables given, no trace of hemolysis occurs in the serum heated at 60° and 65°C, even if the test tubes are exposed at any temperature.

In this respect, the immune serum of rabbits, injected with the human erythrocytes, is quite the same as that of rabbits immunized against the blood corpuscles of chicken. No immune serum of rabbits injected with human erythrocytes causes the hemolysis at room temperature or at 37°C, even if it has been heated to any degree of temperature. But the immune serum of rabbits injected with chicken erythrocytes causes a weak hemolysis at 22°C when it has been heated at 75–90°C, though no hemolysis

TABLE I.

Cold hemolysis by the heated immune serum of rabbits injected
with human erythrocytes.

Rabbits' number	Tubes were placed at temperatures (C)	Heating temperature (C)							Contrast (NaCl)
		60°	65°	70°	75°	80°	85°	90°	
No. 27 After the 1st injection	Incubator (37°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ice box (5°)	—	—	±	+	+	+	+	—
No. 85 After the 2nd injection	Incubator (37°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ice box (5°)	—	—	—	+	+	+	+	—
Control (Norm. serum)	Incubator (37°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ice box (5°)	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLE II.

Cold hemolysis by the heated immune serum of rabbits injected
with chicken erythrocytes.

Rabbits' number	Tubes were placed at temperatures (C)	Heating temperature (C)							Contrast (NaCl)
		60°	65°	70°	75°	80°	85°	90°	
No. 100 After the 2nd injection	Incubator (37°)	—	—	—	±	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	—	—	—	+	—	—	—	—
	Ice box (5°)	—	—	—	+	+	+	+	—
No. 69 After the 3rd injection	Incubator (37°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	—	—	—	+	+	+	+	—
	Ice box (5°)	—	—	±	+	+	+	+	—
Control (Norm. serum)	Incubator (37°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ice box (5°)	—	—	—	±	±	—	—	—

takes place at 37°C. The hemolysis by the immune serum against chicken erythrocytes heated at 75–90°C is very strong when the test tubes have been placed in the ice box (5°C). The strongest hemolysis is seen in the anti-chicken-erythrocytes serum, when it has been heated at 75–80°C, and the test tubes have been exposed at 5°C.

This experiment has been repeated several times and the same results have always been obtained.

In short, it has been proved that both of the above mentioned immune sera of rabbits manifest a power of hemolysing the corresponding erythrocytes at temperatures lower than 22°C, when these sera have been heated at 75–90°C for 30 minutes.

The lower the temperature at which the erythrocytes suspended in the heated serum have been exposed, the stronger this peculiar sort of hemolysis. And no hemolysis takes place if the test tubes have been placed at 37°C, at least in the course of 6 hours. (If the erythrocytes are stored too long, hemolysis occurs as a result of various other factors.)

The hemotoxin which causes this peculiar hemolysis does not require the existence of hemolytic complement in the least, in manifesting its action upon the erythrocytes.

The objection which might be raised in this respect, that some trace of hemolytic complement may remain in the heated serum, and may cause the destruction of erythrocytes with the aid of the immune hemolytic amboceptor, can be contradicted by the fact that the power of cold hemolysis does not manifest itself in the immune sera which have been heated at 60–65°C for 30 minutes.

II. Relationship between the length of heating hour and the strength of cold-hemotoxin in the heated serum.

In the second experiment, I have studied the influence of the length of the time of heating upon the strength of cold-hemotoxin, in order to determine the heat stability of this substance.

The immune sera employed in the previous experiment have

been heated at 75°C, for various length of time, that is 30', 60', 90', etc., and to each 0.9 cc. of the heated sera, 2 drops of the emulsion of corresponding erythrocytes have been added, and left at various temperatures for 6 hours.

The results are given in table III.

TABLE III.
Heat stability of the cold-hemotoxin.

Kind of immune serum	Experimented temperatures (C)	Heating hour			Contrast (NaCl)
		30'	60'	90'	
No. 85 After second injection (Serum of rabbit immunized with human erythrocytes)	Incubator (37°)	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	—	—	—	—
	Ice box (5°)	+	+	+	—
No. 69 After third injection (Serum of rabbit immunized with chicken erythrocytes)	Incubator (37°)	—	—	—	—
	Room temp. (22°)	+	+	+	—
	Ice box (5°)	++	++	++	—

As will be seen in the table, the immune sera which have been heated at 75°C, for various lengths of time, showed no perceptible difference in the strength of the cold-hemotoxin, indicating that this substance can resist, for a pretty long time, the heating at 75°C.

III. *Relationship between the cold-hemotoxin and the strength of other immune substances.*

This experiment has been undertaken in order to settle the question, whether the strength of the cold-hemotoxin has any intimate relationship with the titer of other immune bodies, such as hemoagglutinin, hemolysin, etc., and whether this substance undergoes any change in its strength in the course of immunization of animals.

For this purpose, the parallel estimation of the titer of hemoagglutinin and homolysin, as well as the strength of the cold-

hemotoxin in the serum obtained before each injection of the antigen erythrocytes in the course of immunization was carried out.

In the normal rabbit serum, the strength of the cold-hemotoxin is usually very weak, and sometimes the cold-hemolytic power of the heated serum fails entirely against some sorts of erythrocytes.

These circumstances of normal sera will be described later again in detail.

The titer of hemoagglutinin has been determined by adding 2 drops of 5% emulsion of erythrocytes to 0.9 cc. of the gradually diluted sera and the strength of the immune hemolysin has been estimated by adding 2 drops of 5% emulsion of blood cells as well as 0.4 cc. of complement serum of guinea pigs (diluted to 1/15) to 0.5 cc. of the gradually diluted series of immune sera.

The results are shown in tables IV and V.

TABLE IV.

Parallel estimation of the titer of agglutinin, hemolysin and the cold-hemotoxin in the course of immunization of rabbits with human erythrocytes.

Rabbits' number	Testing temperature (C)	Before injection		After the 1st inject.		After the 2nd nject.		After the 3rd inject.	
		Heating temperature (C)							
		75°	80°	75°	80°	75°	80°	75°	80°
No. 27	Incubator Room temp. Ice box	A.....8 H.....10		A.....128 H.....40		A....1000 H....320		A...16000 H....1280	
		—	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	+	+	—	—	—	—
No. 85	Incubator Room temp. Ice box	A.....8 H.....10		A.....32 H.....40		A.....500 H.....80		A....1000 H....640	
		—	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	+	+	—	—

Note: A=Titer of hemoagglutinin
H=Titer of hemolysin

As will be noticed in the tables, when rabbits are injected with the erythrocytes of man or chicken, the strength of the cold-hemotoxin is augmented already after the first injection of antigen, and the highest value of the cold-hemolytic power is obtained generally after the second or the third injection.

It is a very interesting fact that the enhancement of the cold hemolytic power of serum during immunization does not last very long. Even in the longest case, in my experiments (rabbits No. 60 and No. 100), it has continued only until after the fifth injection of antigen and in some cases (rabbit No. 27) it has disappeared already after the second injection completely, in spite of continuous immunization of the animals.

Now, it is a well known fact that the production of antibodies such as hemoagglutinin, hemolysin etc. is influenced by various factors such as the quantity and the sort of injected antigen, the individuality of immune animals, etc., but the strength or the titer of the produced antibodies reaches sooner or later the maximum value, and the titer of antibodies does not go higher than this limit, even if the injection of antigen is continued.

When the injection is continued further, the titer is reduced gradually in most cases, whereas in some cases the strength of antibodies remains unchanged for some period of time.

In my experiments, described above, the titer of agglutinin and hemolysin has been raised rapidly and continuously up to the fourth or the fifth injection of antigen. It may be said therefore that the titer of these antibodies does not yet reach the maximum or the highest value. On the contrary, the cold-hemotoxin acquires its maximum strength already after the second or the third injection of antigen, and disappears promptly, thereafter, already at the stage of immunization where the production of hemolysin and agglutinin is still vigorously going on.

IV. Adsorbability of the cold-hemotoxin.

This experiment has been performed with the object of deter-

mining the question whether the cold-hemotoxin can be absorbed by the blood cells in the same way as in the case of other antibodies.

For this purpose, I have diluted the immune serum to $\frac{1}{4}$ with the physiological saline solution, heated for 30 minutes at 75°C , and added one drop of 100% emulsion of erythrocytes to 1.0 cc. of the heated serum. After the mixture was placed in the ice box for 30 minutes, it was centrifuged, and the clear supernatant fluid was examined as to its cold-hemolytic power,

As a control test, the heated serum not previously treated with the erythrocytes, was experimented on the same way.

As is shown in table VI, I could not demonstrate the absorbability of cold-hemotoxin in this experiment. Nevertheless, I do not believe that this experiment excludes the absorbability of the cold-hemotoxin.

TABLE VI.
Absorption of the cold-hemotoxin with blood-corpuscles.

Kinds of immune serum	Rabbits' number	Testing temperature(C)	Contract	After adsorption
Serum immune against human blood-corpuscles	No. 27	Incubator	—	—
		Room temp.(22°)	—	—
		Ice box	+	+
	No. 85	Incubator	—	—
		Room temp.(23°)	—	—
		Ice box	+	+
Serum immune against chicken blood-corpuscles	No. 100	Incubator	—	—
		Room temp.(22°)	+	+
		Ice box	±	±
	No. 27	Incubator	—	—
		Room temp.(22°)	±	±
		Ice box	+	+

I believe, on the contrary, that the cold-hemotoxin must be absorbed away from the serum by treating it properly with the erythrocytes, because, as will be described in the next reports, the adsorption could be accomplished in the case of cold-hemotoxin in the heated normal sera.

The negative results in the present experiment were probably due to the insufficiency of the amount of erythrocytes employed.

I will repeat this experiment later and confirm my assumption as soon as experimental materials have been prepared. I have described this experiment here, notwithstanding the negative results, so that others may not repeat the same course.

V. Specificity of the cold-hemotoxin.

No strict specificity can be demonstrated in the action of the cold-hemotoxin. In other words, the cold-hemotoxin in the heated immune serum destroys not only the sort of erythrocytes that have been injected as antigen, but also the blood cells of other kinds.

The immune serum of rabbits which have been injected with the erythrocytes of chickens shows some degree of specificity in its cold hemolysis; that is, the heated serum destroys only chicken erythrocytes, and not those of rabbits, man, cattle, guinea pigs, etc..

On the contrary, however, the immune serum of rabbits which have been injected with the human blood cells, can hemolyse, when heated at suitable temperature, not only the blood cells of man, but also the chicken erythrocytes. The blood cells of cattles and guinea-pigs, also are destroyed by the latter immune serum, though in a weaker degree.

Table VII and VIII show these relationships.

VI. The fractions of serum protein and the cold-hemotoxin.

In order to determine, in what fractions of serum protein this hemolytic substance exists, I have performed the following experi-

TABLE VII.

Specificity of the cold-hemotoxin in the immune serum of rabbits injected with human erythrocytes.

Rabbits' number	Testing temperature (C)	Kinds of erythrocytes						Contrast (NaCl)
		Human	Rabbits (auto)	Rabbits (iso)	Chicken	Cattle	Guinea pig	
No. 27	Incubator	-	-	-	-	-	-	-
	Room temp.	-	-	-	+	-	-	-
	Ice box	+	-	-	+	-	+	-
No. 85	Incubator	-	-	-	+	-	+	=
	Room temp.	-	-	-	+	-	+	-
	Ice box	+	-	-	+	+	+	-

TABLE VIII

Specificity of the cold-hemotoxin in the immune serum of rabbits injected with chicken erythrocytes.

Rabbits number	Testing temperature (C)	Kinds of erythrocytes						Contrast (NaCl)
		Chicken	Rabbits (auto)	Rabbits (iso)	Human	Cattle	Guinea pig	
No. 100	Incubator	-	-	-	-	-	-	-
	Room temp.	+	-	-	-	-	-	-
	Ice box	+	-	-	-	-	-	-
No. 69	Incubator	-	-	-	-	-	-	-
	Room temp.	+	-	-	-	-	-	-
	Ice box	+	-	-	-	-	-	-

ments, employing the rabbit serum immunized with chicken erythrocytes.

A). *Serum treated with CO₂*. To 2.0 cc. of the immune serum of rabbits, were added 8.0 cc. of aqua distillata, and after

carbonic acid from Kipp's apparatus was led into it, until the precipitate no longer increased (about one-half hour). The precipitate was then separated by centrifuging from the albumin part (pseudoglobulin + albumin). The precipitate consists solely of euglobulin. It was dissolved in the physiological saline solution of 5 times of the original volume of serum, and the albumin part (supernatant fluid) was made isotonic by adding crystalline salt.

Both of the two fractions were heated for 30 minutes at 90°C. And to each 0.9 cc. of the heated fraction 2 drops of 5% emulsion of chicken erythrocytes were added and placed the one in incubator, the other at room temperature, and the third in ice box for 6 hours respectively. As is shown in table IX, the cold hemolysis was positive only in the albumin fraction in the ice box and other tests were all negative.

From this experiment, it may be concluded that the hemolytic substance exists in the albumin fraction of serum.

TABLE IX.

The fractions of serum separated by CO₂ method and the cold-hemotoxin.

Rabbits number	Testing temperature (C)	Fraction of serum protein			Contrast (unheated albumin)	Contrast (unheated globulin)
		Albumin fraction	Englobulin fraction	A + G		
No. 20 After the 1st. inject.	Incubator	—	—	—	—	—
	Room temp.	—	—	—	—	—
	Ice box	+	—	+	—	—
No. 69 After the 1st. inject.	Incubator	—	—	—	—	—
	Room temp.	—	—	—	—	—
	Ice box	+	—	+	—	—

B). *The fractions of serum protein separated by means of ammonium sulphate.* For the purpose of fractioning the serum protein an equal volume of saturated solution of ammonium sulphate was added to 2.0 cc. of the immune rabbit serum, and, after

a short time, the mixture was centrifuged. The supernatant liquid is the albumin fraction and the precipitate is the globulin fraction. The latter was dissolved in about 5.0 cc. of aqua distillata. Both fractions were dialized for the elimination of salts, i. e., the two portions were poured into collodion husks and kept in running water for a day. The solutions of the dialized fractions were then made isotonic by the addition of concentrated saline solution, making up their volume to 5 times the original volume of serum.

Both the albumin- and the globulin-portions thus obtained were examined as before.

The results of this experiment were always negative.

Neither the albumin- nor the globulin-fraction manifested the cold-hemolytic property. Such results may be due to the fact that this hemolytic substance is destroyed by the addition of ammonium sulphate.

In the next experiment, half the volume of saturated ammonium sulphate solution was added to 5.0 cc. of the immune serum ($\frac{1}{3}$ saturation). Then the mixture was centrifuged. The precipitate is the euglobulin fraction.

To the clear supernatant fluid (albumin + pseudoglobulin) the saturated solution of ammonium sulphate was added to the half saturation, and again centrifuged. The precipitate thus obtained is the fraction of pseudoglobulin, and the fluid portion is albumin. Each fraction was dialized and made isotonic as before.

These fractions were heated and examined as to their property of cold hemolysis, but none of them manifested the cold hemolytic power.

VII. Immune sera, other than those so far mentioned, and the cold-hemotoxin.

As is described above, the serum of rabbits immunized against human, as well as chicken, blood-corpuscles manifests a peculiar sort of hemolysis when heated at suitable temperature.

Similar experiments were performed with the immune sera of rabbits, injected with the erythrocytes of other animals, such as cattle and guinea pigs.

But the production of the cold-hemotoxin could not be obtained in these cases, though the immune hemolysin in a general sense, as well as the immune hemoagglutinin, were markedly produced.

SUMMARY.

1. When immune sera of rabbits, injected with human or chicken erythrocytes, are heated at 75–90°C for 30 minutes, there occurs a peculiar power in the heated sera; that is, the heated serum destroys the erythrocytes at low temperatures, while it is innocuous to them at 37°C. For this peculiar sort of cold hemolysis, the aid of the hemolytic complement is not necessary.

2. The appearance of the cold hemolytic power in the heated immune sera is conditioned by the degree of the heating temperature, i. e., in the case of rabbits' immune sera, it is entirely negative in the immune sera heated at 60° and 65°C, and only a trace of hemolysis occurs in the serum heated at 70°C, the strongest cold hemolysis takes place in the serum heated at 75°C and 80°C, and further degrees of heating temperature (85–90°C) weaken the property of cold hemolysis of heated sera.

3. The temperature at which the hemolytic agent in the heated serum reacts with erythrocytes is the most characteristic. The lower the temperature, the stronger the hemolysis which takes place in the heated immune sera. The most part of the heated immune sera destroys the added erythrocytes only in the ice box. And the hemolysis is very weak and rare already at room temperature.

4. The production of the cold-hemotoxin does not go parallel with that of other immune bodies, such as agglutinin, hemolysin, etc.. The strength of the cold-hemotoxin is the greatest after the second or the third injection of antigen erythrocytes, and decreases thereafter.

It disappears or comes to normal level after the fifth injection at the latest, though the titer of hemoagglutinin and hemolysin is still going up at this stage of immunization.

5. The cold-hemotoxin in the immune serum of rabbits, injected with chicken erythrocytes, shows a specificity as to its action; that is, it reacts only against chicken erythrocytes.

The cold-hemotoxin in the serum of rabbits injected with human erythrocytes, however, does not show such a strict specificity, and hemolyses not only the human blood cells but also the chicken erythrocytes in a fairly strong degree, and those of cattles and guinea pigs in a slight degree.

6. When the serum protein is separated into fractions by means of CO₂-method, the cold-hemotoxin comes in the albumin fraction.

I wish to express my indebtedness to Prof. K. Yamakami for the guidance and encouragement which he has extended to me in carrying out these experiments.

REFERENCES.

- Kubo, T. (1927): *Shakai Igaku Zasshi*, No. 491.
Kubo, T. (1927): *Japan Medical World*, 17.
Mitsui, T. (1928): *Hokkaido Igaku Zasshi*, 7, No. 3.

EINE KRITIK DER NAKAGAWA-FUJIKAWASCHEN ROTEN MIKROBESTIMMUNGSMETHODE DER GALLENSÄUREN IN DER GALLE.

VON

ISAMU SAKAMOTO UND HOSABURO FUJIKAWA.

(Aus der Medizin. Klinik der Kaiserlichen Universität zu Sapporo.

Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)

(Eingegangen am 20. Januar 1931)

EINLEITUNG.

Die Gallensäuren sind schon seit langer Zeit auf verschiedene Weise quantitativ bestimmt worden. Die dabei angewandten Bestimmungsmethoden kann man nach ihrem Prinzip folgendermassen einteilen:

1. *Gravimetrische Methoden:*— Huppert Neucommon, Hoppe-Seyler, Corftan, Stadelmann, Goodman, Spiro und v. Bergmann(1903) haben sich bemüht, die Gallensäuren chemisch rein und quantitativ zu isolieren und dann gravimetrisch zu messen. Diese Methode ist fraglos die idealste, aber bis jetzt ist es niemandem gelungen, die Gallensäuren einwandfrei chemisch rein und quantitativ zu isolieren.

2. *Stalagmometrische Methoden:* Seitdem Haycraft und Hay die Tatsache angegeben hatten, dass die Gallensäuren äussert oberflächenaktiv sind, haben zahlreiche Forscher, wie Haycraft und Hay, Lepehne (1922) u. a. diese Eigenschaft zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren anzuwenden versucht. Diese Methode hat sich aber bald nachher als fehlerreich erwiesen, weil die Oberflächenaktivität nicht für Gallensäuren allein spezifisch, sondern sehr vielen anderen Substanzen gemeinsam ist. Es kommt deswegen die chemisch reine und quantitative Isolierung der Gallensäuren in erster Linie in Frage, welche aber, wie schon oben erwähnt, bis jetzt fast unmöglich war. Gondaira in unserem

Laboratorium hat ebenfalls eine Methode in dieser Richtung mittels des Du Nöuyschen Tensiometers auszuarbeiten versucht, aber ohne Erfolg.

3. *Kolorimetrische Methoden:* Die Farbenreaktionen sind schon lange als die Pettenkofersche Reaktion und ihre zahlreichen Modifikationen wohl bekannt. (Pettenkofer, Mylius (1887), Udransky(1888), Ville und Derrien, Hammersten, Inoue und Ito(1908), Jolles(1908), Herzfeld und Hämmerli (1924), Paul Szilard(1926), Aldrich und Bledsoe(1928), Gregory und Pascoe(1929). Diese kolorimetrischen Bestimmungsmethoden sind, obwohl sie am einfachsten auszuführen sind, doch reich an Fehlerquellen: erstens ist die Farbenreaktion nicht ganz spezifisch für Gallensäuren, und zweitens benötigt es deswegen einer reinen und quantitativen Isolierung der Gallensäuren.

4. *Gasometrische Methode:* Foster und Hooper (1919) haben als erste eine neue Methode nach einem ganz anderen Prinzip ausgearbeitet, indem sie die gekuppelten Gallensäuren unter Mitwirkung der Alkalien spalteten und die frei gewordenen Aminosäuren nach van Slyke gasometrisch massen. Aus der Menge der freigewordenen Aminosäuren haben sie die gekuppelten Gallensäuren umgerechnet. Rosenthal und Lauterbach(1924) haben nach demselben Prinzip eine andere Methode ausgearbeitet, indem sie die frei gewordenen Aminosäuren nur kolorimetrisch bestimmten. Diese Methode ist als theoretisch einwandfrei anzusehen; aber sie ist sehr zeitraubend auszuführen und brauchbar nur bei einer grossen Menge von Ausgangsmaterial.

5. *Bestimmung durch Fluoreszenzreaktion:* Raue(1926) hat vor einigen Jahren, auf Grund der Tatsache, dass die Gallensäuren unter Einwirkung der konzentrierten Schwefelsäure sehr schöne Fluoreszenz zeigen, eine andere Methode ausgearbeitet. Man bestimmt bei dieser Methode die maximale Verdünnungszahl, bei der noch eben merkbare Fluoreszenz beobachtet wird, und rechnet daraus die Gallensäurenmenge um. Die Methode kann also nicht als eine quantitative Bestimmung, sondern bloss als annähernde

Schätzung gelten.

Erst neuerdings hat Prof. Nakagawa(1930) mit seinen Mitarbeitern Kumekawa und Gondaira eine grüne kolorimetrische Bestimmungsmethode ausgearbeitet. Da an ihr noch einiges zu wünschen übrig war, hat er dann mit Fujikawa(1930) eine verbesserte rote Methode veröffentlicht. Diese beiden Methoden sind sehr einfach und in sehr kurzer Zeit auszuführen und zwar mit einer geringen Menge von Ausgangsmaterial. Deswegen haben wir in dieser Arbeit die Foster-Hoopersche, die Rauesche und die Nakagawasche grüne und rote Reaktion verglichen, mit der Absicht zu prüfen, ob wie sehr einfach ausführbare Nakagawasche rote Reaktion in der Tat praktisch anwendbar ist.

VERSUCHSERGEBNISSE.

A. Versuche mit menschlichem Duodenalsaft.

Es wurden morgens nüchtern mittels Duodenalsonde sogenannte A- und B-Gallen ausgehebert, beide zusammengemischt und damit die Gallensäuren nach den oben genannten vier Methoden bestimmt. Die Gallensäuren sind in dieser Arbeit des Vergleichs halber alle in glykocholsaurem Natrium angegeben.

Zuerst haben wir mit Gallen gearbeitet, die Gesunden oder jedenfalls nicht Leber-Gallenwege-Kranken entnommen waren. Die Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt.

In der Tabelle sind nicht nur die Milligramm-Prozente der Gallensäuren, sondern daneben auch die einfachen Prozentzahlen angegeben, um die Vergleichung übersichtlicher zu gestalten, wobei sie auf die mit der Foster-Hooperschen Methode gewonnenen Werte (als 100%) umgerechnet sind.

Aus der Tabelle ersieht man, dass nach der Rauescher Methode das Maximum 120%, das Minimum 86.5%, der Durchschnitt 100.7% beträgt, während nach der Nakagawaschen roten Methode das Maximum 104%, das Minimum 89.2%, der Durchschnitt 100.5% ist. Hiernach kann man wohl sagen, dass die Rauesche,

TABELLE I.

Diagnose	Gallensäure (glykocol. Na.) (mg %)				(Foster-Hooper als 100 %)		
	Raue	grüne R.	rote R.	Foster	Raue	grüne R.	rote R.
gesund	—	848.0	992.0	987.0	—	58.9	100.5
Darmkatarrh	83.3	86.0	87.0	80.1	104.0	104.5	108.6
	333.0	248.0	342.0	342.1	97.3	72.5	100.0
Neurasthenie	100.0	80.2	103.0	115.7	89.4	77.0	89.2
	100.0	61.0	92.0	96.0	104.1	36.5	96.9
gesund	667.5	318.0	693.0	703.9	90.1	40.2	98.0
	500.0	400.0	496.0	482.6	103.1	83.9	102.9
Hirner- weichung	250.0	248.0	240.0	240.7	103.9	103.0	103.0
	333.3	325.0	345.0	340.2	90.8	90.5	101.0
	417.0	258.0	444.0	430.3	96.8	62.0	103.0
	417.0	235.0	360.0	340.2	122.2	69.0	105.9
	208.3	200.0	202.0	202.0	102.9	99.0	100.0
	333.3	295.0	360.0	363.0	91.8	89.3	99.1
	250.0	204.0	282.8	282.8	88.3	72.2	99.8
	1500.0	1530.0	1548.0	1568.5	95.9	97.5	99.0
Tabes dorsalis	583.0	472.0	560.0	548.8	103.2	86.0	102.0
	667.0	640.0	656.0	646.8	103.1	100.0	101.4
	208.3	179.0	198.0	190.0	109.0	94.5	104.0
	1666.0	1760.0	1800.0	1809.0	92.0	97.2	99.5
	83.3	71.0	83.0	84.8	98.0	83.7	97.7
	Durchschnitt:				100.7	83.2	100.5

die Nakagawasche rote und die Foster-Hoopersche Methode ziemlich gut übereinstimmende Resultate zeigen. Im Gegensatz dazu zeigt die Nakagawasche grüne Reaktion im allgemeinen in der Galle zu niedrige Werte, was ihn eben, wie er schon in seiner Mitteilung betonte, zu einer Verbesserung der Methode veranliess.

Die Foster-Hoopersche Methode gibt die Werte der gekuppelten Gallensäuren an, gleichviel, ob die Aminosäuren an Cholsäure oder an Desoxycholsäure gebunden sind. Die rote und die grüne Reaktion sind nach der Angabe der Verfasser Reaktionen der Cholsäure; die Desoxycholsäure reagiert gegen die Methode viel schwächer oder nicht. Andererseits wird jetzt angenommen, dass Desoxycholsäure in der menschlicher Galle normalerweise vorkommt. Wenn dies der Fall wäre, so könnte man voraussehen, dass die Werte der grünen und der roten Reaktion etwas geringer sein sollten wie die der Foster-Hooperschen. Dies war aber nicht der Fall bei der roten Reaktion. Die Frage, warum nur die grüne Reaktion fast immer zu niedrige Werte zeigt, kann man nicht beantworten; man kann nur einerseits das etwaige Vorhandensein unklarer hemmender Substanzen in den Gallenextrakten annehmen, oder andererseits vermuten, dass die Gallensäuren unter irgendwelchen Bedingungen ihre Struktur verändern, sodass sie gegen die grüne Reaktion nicht mehr oder viel schwächer reagieren. Deswegen haben wir weitere Untersuchungen mit Galle, welche aus an Leber- oder Gallenwege-Krankheiten Leidenden gewonnen war, angestellt, unter der Voraussetzung, dass die Gallensäuren bei Krankheiten in pathologisch verändertem Zustande ausgeschieden werden könnten.

In Tabelle II haben wir die Resultate zusammengestellt, welche mit Galle von Leber-Gallenwege-Kranken gewonnen sind.

Aus der Tabelle sieht man, dass die grüne Reaktion ebenfalls zu niedrige Werte zeigt, während die rote Reaktion und die Rauesche Methode fast immer zu befriedigenden Resultaten kommen. Wir konnten also gar keinen Unterschied zwischen gesunden und pathologischen Gallen feststellen.

TABELLE II.

Diagnose	Gallensäuren (glykchol. Na.) (mg %)				(Foster-Hooper als 100 %)		
	Raue	grüne R.	rote R.	Foster	Raue	grüne R.	rote R.
Gallen- steinkr.	750.0	712.0	744.0	774.9	96.7	91.8	69.0
	500.0	444.0	456.0	485.5	112.9	91.4	93.9
	333.0	336.0	375.0	371.6	92.1	92.9	103.7
	833.0	752.0	752.0	824.5	111.0	91.2	91.2
	166.0	152.0	166.0	160.4	100.3	94.7	100.3
	58.3	61.5	61.5	62.3	93.5	98.7	98.7
	83.0	83.2	86.0	86.3	96.2	66.5	99.7
	500.0	504.0	525.0	522.8	95.6	56.4	100.4
	750.0	612.0	708.0	683.7	109.7	89.5	103.5
	580.0	532.0	590.0	645.5	89.4	82.4	19.4
Gallenstein- krankheit	250.0	236.0	272.0	263.8	94.7	98.7	103.1
	333.0	281.0	370.0	363.0	64.7	77.4	101.9
	58.0	42.0	570.0	57.6	100.7	72.9	99.9
	417.0	360.0 420.0	370.0	394.0	105.8	91.3	93.9
	333.0	304.0	326.0	321.4	103.5	94.5	101.0
Leberlues	20.8	unmessb.	16.0	unmessb.	—	—	—
	66.7	50.4	63.2	60.2	110.7	83.6	104.1
	116.6	68.0	116.0	120.6	96.6	56.3	96.1
	83.3	64.8	79.4	80.4	103.6	80.5	98.7
Chole- cystitis	75.0	30.6	33.9	unmessb.	—	—	—
	166.0	130.0	135.0	129.2	128.4	100.6	104.5
	133.0	136.0	137.0	139.6	95.2	97.4	98.1
	33.0	27.2	20.0	20.2	163.3	85.1	99.0
	116.0	82.5	95.0	98.8	117.4	92.6	95.1
	100.0	83.0	90.0	100.5	99.5	82.5	89.5
	50.0	40.0	41.0	40.2	121.6	99.5	101.9
	125.0	90.0	122.0	121.3	103.0	74.1	100.5
	50.0	48.0	50.0	40.2	124.3	121.8	124.3
	250.0	108.0	248.0	211.5	118.1	51.0	117.1

Chole- cystitis	166.6	128.0	169.0	200.1	83.2	63.9	84.4
	25.0	16.6	31.0	20.0	124.9	82.9	154.9
	100.0	69.6	99.2	80.0	125.0	87.0	124.0
	16.6	unmessb.	12.5	unmessb.	—	—	—
	25.0	unmessb.	27.0	unmessb.	—	—	—
	75.0	57.0	60.0	60.5	123.8	94.2	99.0
	75.0	67.0	66.0	60.3	124.3	111.1	109.4
Leberlues	417.5	450.0	453.0	439.4	94.9	102.4	103.1
	208.0	240.0	240.0	239.6	86.8	100.0	100.2
	1000.0	948.0	996.0	948.6	105.3	93.8	105.0
	1000.0	752.0	760.0	918.6	108.8	81.5	82.7
	750.0	732.0	900.0	897.9	83.5	81.5	100.2
	580.0	544.0	524.0	591.6	98.0	91.9	88.5
	666.0	664.0	664.0	643.3	103.6	34.8	93.8
	333.0	256.0	300.0	327.2	97.7	112.2	108.2
	133.0	94.0	114.0	120.3	110.5	78.1	94.7
	133.0	126.0	152.0	154.3	86.3	81.6	98.4

B. Versuche mit Hunde- und Kaninchengalle.

Bei der Galle, welche aus Gallenblase oder Choledochusfistel von Hunden gewonnen ist, zeigen die grüne und die rote Reaktion fast immer mit der Foster-Hooperschen Methode gut übereinstimmende Werte, wie aus Tabelle III ersichtlich ist.

TABELLE III. Hundegalle.

Nr.	Gallensäuren (glykochols. Na.) (mg %)				Foster-Hooper als 100 %		
	Raue	grüne R.	rote R.	Foster	Raue	grüne R.	rote R.
1	—	4352.0	4636.0	4343.8	—	100.5	106.0
2	—	4320.0	4634.0	4343.8	—	99.8	106.0
3	—	2152.0	2192.0	2171.9	—	99.3	100.6
4	7500.0	7560.0	7560.0	7239.6	103.6	104.2	104.0

Bei Kaninchengallen verhält es sich aber ganz anders. Mit der grünen Reaktion erhält man immer zu niedriger Werte, und ausserdem ist die Farbennuance manchmal nicht ganz identisch mit der Standardfarblösung, was die Farbenvergleichung erschwerte. Die rote Reaktion fällt, obwohl sie höhere Werte als die mit der grünen Methode erhaltenen zeigt, auch immer zu niedrig aus. Die Rauesche Reaktion zeigt deshalb, mit der Foster-Hooperschen Methode vergleichen, die am meisten annähernden Werte.

Aus diesen Ergebnissen kann man schliessen, dass die grüne

TABELLE IV. Kaninchengalle.

Nr.	Gallensäuren (als glykochols. Na.) (mg %)				(Foster als 100 %)		
	Raue	grüne R.	rote R.	Foster	Raue	grüne R.	rote R.
1	250	96	238	261	97	36.9	91.2
2	208	132	196	199	104	66.9	58.3
3	292	152	270	281	103	53.8	96.3
4	333	77	180	362	92.2	21.4	49.8
5	166	unmessb.	162	179	93	—	90.3
6	125	„	111	119	104.7	—	93.5
7	—	„	50	58	—	—	86.3
8	125	„	69	77	162	—	89.5
9	75	„	71	77	97.5	—	92
10	333	8.6	312	345	96.2	2.5	90.5
11	166	unmessb.	55	251	77	—	30.2
12	333	„	196	385	89.1	—	50
13	125	„	95	180	70	—	53
14	120	„	50	182	65.9	—	27.4
15	166	„	80	232	71.5	—	34
16	333	„	189	423	79	—	44.6
17	208	„	126	222	93.4	—	56.6
18	333	50	145	351	86.8	14.2	41.3
19	100	25	58	120	93.3	28.3	48.3
20	125	30	100	135	93.3	22.2	73.3

und die rote Reaktion für Kaninchengalle ganz unbrauchbar sind, wie die Erfinder der beiden Methoden in ihren Beschreibungen schon betont haben. Dies kommt wahrscheinlich daher, dass in der Kaninchengalle sehr viel Desoxycholsäure enthalten ist.

SCHLUSSFOLGERUNG.

Die Foster-Hoopersche Methode ist für die quantitative Bestimmung der gekuppelten Gallensäuren in der Galle zweifellos zur Zeit die idealste, aber sie ist nicht einfach, sondern nur mit einer relativ grossen Menge von Ausgangsmaterials und ausserdem nur sehr zeitraubend auszuführen. Deswegen ist sie für Serienversuche mit einer kleinen Menge Material nicht geeignet. Die Rauesche Methode gilt als sehr einfach und zwar als eine Mikromethode. An dieser Methode haftet aber noch der Fehler, dass sie keine quantitative Bedeutung im strengen Sinne besitzt, sondern bloss Schätzungswerte gibt.

Die kolorimetrische Methode ist ohne Zweifel die einfachste, aber bei ihr muss man zuerst die Gallenfarbstoffe beseitigen, ohne Gallensäure zu verlieren. Dies war früher eine nicht überwundene Schwierigkeit. Prof. Nakagawa ist es aber endlich gelungen, diese Schwierigkeit zu überwinden, indem er einerseits die Gallenfarbstoffe mit Tierkohle entfernt, und anderseits gleichzeitig im alkalischen Medium die Gallensäuren praktisch vollkommen extrahiert. Durch diese Extraktionsmethode wurde die quantitative kolorimetrische Bestimmung der Gallensäuren sehr erleichtert. Ausserdem hat Prof. Nakagawa mit Fujikawa die rote Reaktion ausgearbeitet, welche als praktisch für Gallensäure (Cholsäure) spezifisch anzusehen ist. Die rote Reaktion ist deshalb als ein ausgezeichnetes Mittel für die Bestimmung der Gallensäuren in der Galle zu bezeichnen.

Bei allen kolorimetrischen Bestimmungen spielt bei der Farbenvergleichung die Subjektivität ohne Zweifel eine sehr grosse Rolle; diesen Nachteil teilt die rote Reaktion mit allen anderen kolorimetrischen Bestimmungen. Deswegen haben wir bei unserer ver-

gleichenden Untersuchung zuerst mit der grünen und der roten Farbenreaktion gemessen und die erhaltenen Werte notiert. Am nächsten Tage erst gewannen wir die Resultate mit der Raueschen und der Foster-Hooperschen Methode. (Beim Ablesen des Gasvolumens bei der Fosterschen Methode spielt die Subjektivität keine so grosse Rolle wie bei der kolorimetrischen Methode.) Wir haben auf diese Weise die Werte verglichen, um nicht unbewusst die Werte der Kolorimetrie denen der Fosterschen Methode möglichst nahe kommen zu lassen. Wenn wir trotzdem bei der roten Reaktion fast befriedigende Werte bekamen, so beweist dies, dass die Methode klinisch brauchbar ist.

Aus unsern Versuchsergebnissen lässt sich so folgern:

1. Die Nakagawa-Fujikawasche rote Farbenreaktion beweist sich als praktisch brauchbar, obwohl sie sehr einfach und in sehr kurzer Zeit auszuführen ist.

2. Die Methode kann nur bei menschlicher und Hunde-Galle benutzt werden. Bei Kaninchengalle ist sie vollkommen unbrauchbar.

LITERATUR.

- Aldrich und Bledsoe (1928): Studies in the metabolism of bile, J. of biol. chem., **77**, 519.
- v. Bergmann (1903): Ueberführung von Zystin und Taurin im tierischen Organismus, Beitr. f. chem. Physiol. u. Path., **4**, 192.
- Foster and Hooper (1919): The metabolism of bile acids, J. of biol. chem., **38**, 355.
- Gregory und Pascoe (1929): The quantitative Determination of bile acids by means of a new color reaction and monochromatic light, J. of biol. chem., **83**, 35.
- Herzfeld und Hämmerli (1924): Die Galle im Stoffwechsel, Schweiz. med. W. **141**.
- Inoue und Ito (1908): Ueber eine Farben- und Spektralreaktion der Gallensäuren mit Vanillin und Schwefelsäure, Zs. f. physiol. Chem., **57**, 313.
- Jolles Über eine neue Gallensäurenreaktion und über den Nachweis der Gallensäuren im Harn, Zs. f. physiol. Chem., **57**, 30.
- Lepehne (1922): Klinische W. Nr. 41.

- Mylius (1887): Zur Kenntnis der Pettenkofer'schen Gallensäurenreaktion, Zs. f. physiol. Chem., **11**, 492.
- Nakagawa und Fujikawa (1930): Eine neue kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der Galle (rote Reaktion) diese Zs. **12**, 399
- Nakagawa, Kumekawa und Gondaira (1930): Eine neue kolorimetrische quantit. Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der Galle (grüne Reaktion), Hokkaido Igaku-Zasshi., **8**, 67.
- Raue (1926): Über den Gallenstoffwechsel, Zs. f. klin. Med. **102**, 79.
- Rosenthal und Lauterbach (1925): Beitr. z. Physiol und Path. der Gallensekretion, IV, Arch. f. exp. Path. und Pharm., **101**, 1,
- Szilard (1926): Eine neue kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der gallensauren Salze im Blute, Bioch. Zs. **173**, 440.
- Udransky (1888): Über Furfurolreaktion, Zs. physiol. Chem., **12**, 355.

ÜBER DIE NAKAGAWASCHE EXTRAKTIONS- METHODE FÜR GALLENSÄUREN AUS DER GALLE UND DEREN THEORETISCHE ÜBERLEGUNGEN.

VON

SATOSU NAKAGAWA UND KOICHI YOSHIKAWA.

(Aus der Mediz. Klinik der Kaiserlichen Universität zu Sapporo.

Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)

(Eingegangen am 20. Januar 1931)

I. EINLEITUNG.

Der eine von uns (Nakagawa, 1930) hat kürzlich mit seinen Mitarbeitern (Kumekawa, Gondaira und Fujikawa) eine neue kolorimetrische quantitative Bestimmungsmethode der Gallensäuren an menschlicher und Hunde-Galle veröffentlicht, nachdem er eine neue Extraktionsmethode für Gallensäuren ausgearbeitet hatte. Diese Extraktion war lange Zeit sehr schwer, wie in einer früheren Arbeit näher ausgeführt. Die Nakagawasche Extraktionsmethode beruht darauf, dass sich die Gallensäuren in stark ammoniakalischem Medium einerseits mit Alkohol extrahieren, und dass sich andererseits die Gallenfarbstoffe mit Tierkohle adsorbieren lassen. Durch die Alkalisierung des Mediums konnte Nakagawa empirisch beweisen, dass diese Extraktion praktisch vollkommen brauchbar ist.

Die Literatur über Kohle bei der Gallensäurenextraktion ist in der vorigen Arbeit genau besprochen worden. Hier sei nur kurz erwähnt, dass man bisher zur Galle oder zum Blute bei natürlicher, ganz schwach alkalischer Reaktion Tierkohle und Alkohol zusetzte. Nach Angabe von Wit (1929) soll die Tierkohle unter den verschiedenen Adsorbentien am intensivsten zu entfärben imstande sein, und zwar besonders kräftig in saurem Medium. Jedoch zog Wit nicht in Betracht, ob sich die Gallensäuren dabei

quantitativ völlig extrahieren liessen oder nicht. Dass die Tierkohle eine nicht zu vernachlässigende Menge von Gallensäuren sogar bei Gegenwart von Alkohol an sich adsorbiert, ist durch die Versuche vieler Forscher schon klar gestellt worden; und deswegen haben einige Autoren, wie Raymond Gregory und T. A. Pascoe (1929), vollkommen darauf verzichtet, bei der quantitativen Extraktion der Gallensäuren Tierkohle überhaupt zu gebrauchen, oder versucht, sich mit Holzkohle (Norit=aktivierte Holzkohle) zu begnügen, wie Marie Charlet (1929), trotzdem auch sie bestätigen musste, dass Norit ebenso Gallensäuren an sich adsorbierte.

Trotz dieser Misserfolge vieler Forscher ist es Nakagawa gelungen, bloss durch starke Alkalisierung des Mediums die Adsorption der Gallensäuren an Kohle auf ein Minimum herunterzudrücken und dadurch die Extraktion derselben zu vereinfachen. Mit der vorliegenden Arbeit haben wir nun beabsichtigt festzustellen, wie viel pH des Mediums bei der Extraktion nötig ist, und weiter zu untersuchen, welche theoretische Bedeutung diese Alkalisierung hat.

II. WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION BEI EXTRAKTION DER GALLENSÄUREN.

Weil es unbedingt notwendig ist, bei der Extraktion der Gallensäuren in alkalischem Medium zu arbeiten, so haben wir erst zu bestimmen versucht, wie viel pH dabei nötig und am geeignetsten ist. Dabei haben wir in folgender Weise verfahren: Man fügte zur Galle erst Ammoniak in steigender Menge und eine bestimmte Menge von Alkohol, danach die aliquote Menge von Tierkohle hinzu. Aus dieser Lösung haben wir die Gallensäuren mit der Nakagawa-schen roten Reaktion bestimmt. Die Tierkohle haben wir in diesen Versuchen bloss nach Augenmass in einer gerade für die Entfärbung notwendigen minimalen Menge hinzugesetzt, ohne sie gravimetrisch zu messen. Die pH-Messung geschah nach der Gaskettenmethode vor dem Zusatz der Kohle.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich feststellen, dass die Reaktion

TABELLE I.

Menschlicher Duodenalsaft je 0.5 ccm.

Carbo medicinalis Merck beliebig.

Nr.	Essigsäure (ggt)	Ammoniak (ggt)	Alkohol (abs.) (ccm.)	Na. glycochol, (mg %)	pH vor Zusatz v. Kohle
I		0	je 10	unmessbar	7,13
		1/40 1 gt		—	8,43
		1/4 1 „		—	9,35
		1		12,8	9,80
		2		14,8	10,01
		3		14,2	10,12
		4		15,2	10,21
		5		15,2	10,36
		7		15,2	10,60
		10		15,2	10,71
II	10	0	je 10	61,0	4,80
	5	0		143,0	5,22
	1	0		60,8	5,96
	0	0		160,0	7,15
	0	1		211,2	9,77
	0	3		228,8	10,14
	0	5		228,8	10,30
III	10	0	je 15	30,8	5,60
	5	0		13,2	6,00
	1	0		20,0	6,65
	0	0		92,8	9,61
	0	1		99,2	10,02
	0	3		108,0	10,27
	0	5		105,0	10,34

bei der neutralen Extraktion sehr schwach ausfiel, während bei der alkalischen Extraktion die Werte immer mehr ansteigen, je alkalischer das Medium reagiert, bis zu pH oberhalb 10, und ferner dass sie in saurem Medium sehr viel niedriger sind als in der stark alkalischen Reaktion. Hierbei scheint es uns sehr paradox zu sein, dass die Werte in saurem Medium sehr schwankend ausfallen; die Werte steigen nicht parallel ab mit absteigendem pH, sondern fallen bald hoch, bald niedrig aus. Das kommt wahrscheinlich daher, dass wir in diesen Versuchen die Tierkohlenmenge nicht genau gleich, sondern nach Augenmass wählten. Das der Wert im III. Versuche ohne Zusatz von Essigsäure oder Ammoniak schon sehr hoch ist, ist dadurch zu erklären, dass der gemessene pH-Wert schon 9,61 beträgt, was darauf beruht, dass der Alkohol schon alkalisch reagierte.

Was die Beziehung zwischen Tierkohlenmenge und Adsorption der Gallensäuren anbelangt, so haben wir mit einer absteigenden Menge der Tierkohle *ceteris paribus* gearbeitet.

Aus Tabelle II stellt sich heraus, dass die gefundenen Gallensäurenwerte bei neutraler Extraktion desto niedriger gefunden werden, eine je grössere Kohlenmenge benützt wird. Im Gegensatz dazu sind die Gallensäurenwerte bei der stark alkalischen Extraktion trotz wechselnder Kohlenmenge fast konstant. Obwohl die Werte bei grösserer Kohlenmenge auch hierbei etwas niedriger ausfallen wie bei kleinerer Kohlenmenge, so sind die Unterschiede doch sehr klein, wenn man sie mit denen bei der neutralen Extraktion vergleicht. Hieraus kann man schliessen, dass das alkalische Medium oberhalb pH 10 die Adsorptionskraft der Tierkohle gegen Gallensäuren bis zu einem Minimum herabdrücken kann. Deswegen braucht man bei stark alkalischer Extraktion wie bei der Nakagawaschen Methode, gar kein grosses Gewicht auf die Kohlenmenge zu legen, trotzdem es am besten ist, nur die für die Entfärbung eben notwendige Kohlenmenge zu gebrauchen. Eine entbehrliche überschüssige Menge von Kohle bringt keinen Vorteil, sondern immer Schaden.

TABELLE II.

Menschl. Duodenalsaft je 0,5 ccm, Alkohol je 10 ccm.

Nr.	Ammoniak (ggt)	Tierkohle (mgm)	Na. glycochol, (mg %)
I	5	12,5	152,0
	5	25,0	147,0
	5	37,5	147,0
	5	50,0	147,0
	0	12,5	139,2
	0	25,0	126,4
	0	37,5	110,4
	0	50,0	108,0
II	5	10	95,0
	5	20	92,5
	5	30	90,0
	5	50	92,8
	0	10	88,8
	0	30	65,6
	0	50	36,6

Nach Michaelis ist die Tierkohle ein Ampholyt oder Ampholytoid; sie adsorbiert an sich H- oder OH-Ionen, je nachdem das Medium, mit dem isoelektrischen Punkt der Kohle verglichen, saurer oder alkalischer reagiert. Deswegen ist es denkbar, dass die gemessenen pH-Werte in den oben angegebenen Versuchen nicht die wirklichen Werte anzeigen könnten. In diesen Versuchen haben wir deshalb pH erst nach dem Zusatz von Kohle gemessen.

Tabelle III zeigt uns klar, dass die Gallensäurenwerte bei saurer Extraktion und bei konstanter Menge von Kohle mit dem absteigenden pH-Wert parallel abnehmen. Die alkalische Extraktion bringt uns steigend grössere Werte, je alkalischer das Medium reagiert. Wenn der pH-Wert aber 10 überschreitet, so zeigt sich ein konstanter Wert. Die Galle wird bei diesem pH noch vollkommen entfärbt.

TABELLE III.

Menschl. Galle je 0.5 ccm, Alkohol 15 ccm, Tierkohle je 30 mg.

Nr.	Essigsäure (ggt)	Ammoniak (ggt)	Na. glycochol, (mg %)	pH
I	10	0	10,4	4,79
	3	0	13,2	5,20
	1	0	13,2	5,63
	1/4	0	21,6	6,25
	0	0	30,4	7,56
	0	1/40	31,2	8,56
	0	1/4	21,2	9,48
	0	1	31,2	9,87
	0	2	34,8	10,16
	0	5	34,8	10,55
	0	10	34,8	10,80
II	10	0	51,0	4,77
	3	0	50,8	5,20
	1/4	0	61,8	6,18
	0	0	68,0	7,50
	0	1/40	75,0	8,39
	0	1/4	78,0	9,43
	0	1	82,0	9,85
	0	2	84,0	10,15
	0	5	84,0	10,56

Aus diesen Ergebnissen kann man daher schliessen, dass es absolut notwendig ist,—um einerseits die Gallen vollkommen mit Kohle zu entfärben und anderseits die Gallensäuren mit Alkohol ohne Verlust zu extrahieren,—das Medium stark alkalisch und zwar über pH 10 zu machen. Die empirisch gefundene Nakagawasche Extraktionsmethode erfüllt diese Bedingung vollkommen.

III. THEORETISCHE ÜBERLEGUNGEN ÜBER DIE NAKAGAWASCHE EXTRAKTIONSMETHODE.

Es ist oben klar herausgestellt, dass die Nakagawasche Extraktionsmethode die praktisch vollkommene Extraktion der Gallensäuren trotz Vorhandenseins stark adsorbierender Tierkohle ermöglicht. In diesem Kapitel versuchen wir nun diese Methode auch theoretisch zu erklären.

Um die Gallensäuren für die kolorimetrische Bestimmung aus der Galle vollkommen zu extrahieren, muss man zwei Bedingungen vollständig erfüllen: erstens vollkommene Entfärbung der Galle mittels Tierkohle und zweitens vollständige Hemmung der Adsorption der Gallensäuren an die Tierkohle. Zuerst werden wir die Hemmung der Adsorption der Gallensäuren behandeln.

Wenn man in einem System die Adsorption irgendeiner Substanz an das Adsorbens verhindern will, so kommen zwei Methoden in Betracht. Die eine ist die sogenannte Adsorptionsverdrängung und die andere die elektrische Ladung. Wird z. B. in zuckerhaltigen Harn Tierkohle zum Zweck der Entfärbung hineingebracht, so wird an die Kohle neben den Harnfarbstoffen Harnzucker adsorbiert. Nach Rona und v. Töth (1926) wird aber diese Adsorption des Zuckers verdrängt beim Vorhandensein von stark oberflächenaktiven Substanzen, wie Säuren der Fettersreihe. Kolthoff (1926) hat ebenso nachgewiesen, dass Phenol—eine oberflächenaktive Substanz—auch eine adsorptionsverdrängende Wirkung beim Zuckerharn ausüben kann, und dass die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums bei der Adsorption des Zuckers keinen Einfluss ausübt, dass aber die adsorptionsverdrängende Wirkung des Phenols beim Zusatz von Säuren sehr verstärkt wird.

Die zweite Methode für die Adsorptionshemmung ist die elektrische Ladung. Keeser (1923) hat klar herausgestellt, dass die Adsorption von KJ, Na salicylicum und Chininum hydrochloricum von der elektrischen Ladung der Tierkohle stark abhängig ist, und zwar dass Jod- und Salicylsäure-Ionen von der positiv geladenen

Kohle, Chinin-Ionen von der negativ geladenen Kohle adsorbiert werden. Von diesem Gesichtspunkte aus kann man voraussetzen, dass die Substanz bei mit der Ladung des Adsorbens elektrisch gleichnamiger Ladung am wenigsten adsorbiert werden könnte. Deswegen haben wir die Sache zuerst vom Standpunkt der elektrischen Ladung betrachtet.

1. *Zustandchemie der Kohle, der Gallensäuren und des Bilirubins.*

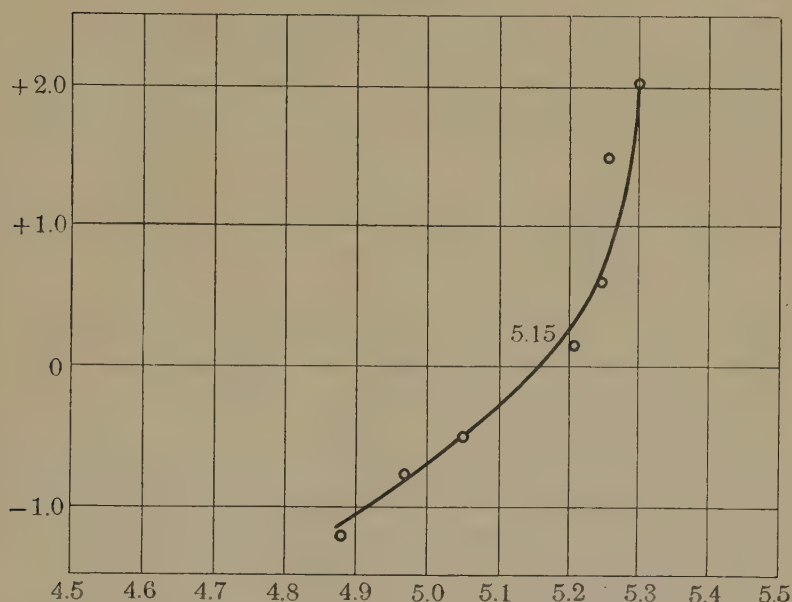
Tierkohle. Nach Michaelis ist die Tierkohle ein Ampholyt oder ein Ampholytoid; sie wird positiv oder negativ geladen, je nachdem das Medium saurer oder alkalischer reagiert als ihr isoelektrischer Punkt. Deswegen haben wir zuerst den isoelektrischen Punkt der Carbo medicinalis Merck, welche bei der Nakagawaschen Methode gebraucht wird, mit Hilfe des Neutralisationseffekts der Kohle bestimmt. Man fügte zu 10 ccm der Phosphatpuffer 2 g Tierkohle hinzu, schüttelte eine Stunde und mass die pH-Werte des Mediums vor und nach Zusatz von Kohle.

TABELLE IV.

Nr.	Angenommen			pH gemessen		
	$\frac{M}{1500} \text{H}_2\text{PO}_4$	$\frac{M}{75} \text{KH}_2\text{PO}_4$	$\frac{M}{75} \text{Na}_2\text{HPO}_4$	ohne Kohle	mit Kohle	Differenz
1	5,0	5,0	—	3,65	4,88	-1,19
2	2,0	8,0	—	4,21	4,97	-0,76
3	1,0	9,0	—	4,55	5,05	-0,50
4	—	9,75	0,25	5,37	5,21	+0,16
5	—	9,5	0,5	5,86	5,25	+0,61
6	—	7,0	3,0	6,74	5,26	+1,48
7	—	3,0	7,0	7,33	5,30	+1,03

Wie aus Tabelle IV und Abbildung I ersichtlich ist, liegt der I. P. der Tierkohle in der Nähe von pH 5,65. Deswegen wird

Abbildung 1.



vermutet, dass Tierkohle in stark alkalischem Medium vollkommen negativ geladen ist.

Stabilität der Tierkohle. Tierkohle gehört als ein absolut unlösliches, nicht molekulardisperses Ampholyt zu den hydrophoben Kolloiden. Deshalb ist die Stabilität der Kohlepartikelchen hauptsächlich von der Potentialdifferenz der Partikelchen abhängig, und die Potentialdifferenz ist am kleinsten gerade am isoelektrischen Punkt. Wir haben also in saurem und alkalischem Medium Tierkohle hinzugesetzt und beobachtet, ob die Kohlepartikelchen stabil seien oder nicht.

Tabelle V zeigt uns, dass im Medium von pH 8,26–12,44 die Kohlenpartikelchen stabil suspendiert sind und sich weder abzentrifugieren noch abfiltrieren lassen. In noch alkalischerem Medium setzen sich die Partikelchen wieder als Konglomerat ab. Das kommt wahrscheinlich daher, dass die Zunahme der Na-Ionen auf

TABELLE V.

Nr.	HCl n.	NaOH n.	pH (nach Zusatz v. Kohle)	Trübungen.		
				n. 2 Std.	Filtrat	Beim Zusatz v. 0.1 cem 3n NaCl
1		—	5,67	—	—	—
2		0,00001	5,89	—	—	—
3		0,0001	5,98	—	—	—
4		0,001	8,26	+	+	—
5		0,01	11,32	+	+	—
6		0,05	12,44	+	+	—
7		0,1	12,61	—	—	—
8	—		5,67	—	—	—
9	0,00001		4,93	—	—	—
10	0,0001		—	—	—	—
11	0,001		3,64	—	—	—
12	0,01		2,39	—	—	—
13	0,1		1,15	—	—	—

die Kohlepartikelchen schon niederschlagend einwirkt. Diese Erklärung lässt sich aus der Tatsache als richtig beweisen, dass die Kohlepartikelchen durch Zusatz von Natriumchlorid ihre Stabilität vollkommen einbüßen, wie aus der Tabelle ersichtlich ist. Es ist aus dieser Tatsache sehr leicht zu verstehen, dass man bei der Nakagawaschen Extraktionsmethode die schwer abfiltrierbaren Kohlepartikelchen durch Zusatz einer kleinen Menge von Natriumcarbonat leicht abfiltrieren kann. In saurem Medium sollte man noch eine stabile Trübungszone erwarten, was aber nicht der Fall war. Das ist in der Weise zu erklären, dass die Cl-Ionen, weil der I. P. der Kohle sauer liegt, schon die Kohle zum Niederschlag veranlassen.

Bilirubin. Das Bilirubin gilt nach Fischer als eine einwertige schwache Säure und nach Küster als eine zweiwertige Säure. Ogawa (1928) hat die Dissoziationskonstante des Bilirubins aus

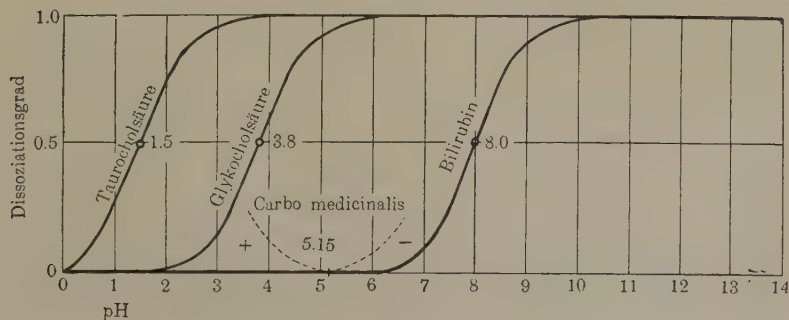
der Titrationskurve zwischen pH 7–8 gefunden und daraus das Bilirubin als zweiwertige Säure bewiesen.

Gallensäuren. Nach Bondi (1907) soll Glykocholsäure etwas stärker als Milchsäure und schwächer als Essigsäure, und Taurocholsäure wahrscheinlich stärker als Glykocholsäure sein. Ogawa (1928) zufolge sollen die Dissoziationskonstanten der Glyko- und Taurocholsäure $K=10^{-3.8}$ bzw. grösser als $10^{-1.5}$ sein.

2. Verhütung der Adsorption der Gallensäuren an Kohle.

A. *Elektrische Ladung.* Es ist leicht zu verstehen, dass Gallensäuren an Kohle am wenigsten adsorbiert werden sollten, wenn sie beide elektrisch gleichnamig geladen sind. Die Tauro- und Glykocholsäure besitzen ihren isoelektrischen Punkt, wie oben beschrieben, in pH 1,5 bzw. 5,8 im wässrigen Milieu, deswegen sind sie theoretisch vollkommen dissoziiert und negativ geladen, wenn das Medium alkalischer als pH 5,8 reagiert. Tierkohle andererseits wird negativ geladen in einem Medium, welches alkalischer als ihr I. P. (pH 5,15) ist. Deswegen könnte man erwarten, dass je alkalischer das Medium reagiert, desto mehr die Adsorption der Gallensäuren an die Kohle abnehmen, und die gefundenen Gallensäurenwerte immer grösser sein würden. (Abbildung 2). Unter diesen Voraussetzungen haben wir mit reiner Natriumglykocholat-

Abbildung 2. Dissoziationskurven im wässrigen Milieu.
(schematisch)



lösung in der Weise gearbeitet, dass wir 1 ccm von 97,2 mg% iger Natriumglykocholatlösung, 0,4 ccm 3 n NaCl, und eine verschiedene Menge von HCl oder NaOH zusammenbrachten, mit Aq. destillata auf 20 ccm auffüllten und endlich 40 mg Tierkohle zfügten. Nach Filtration haben wir einerseits pH und anderseits die Gallensäuren quantitativ bestimmt.

TABELLE VI. Anfangskonz, d. Na, glykochol 97.2 mgm %

Nr.	pH	Na, glykocholium (mgm %)	
		gefunden	Verlust
1	1,21	unmessbar	
2	1,86	„	
3	3,03	15,0	82,2
4	4,50	17,5	79,7
5	5,29	18,5	78,7
6	7,49	16,8	80,4
7	9,23	18,2	79,0
8	10,69	16,0	81,2

Aus den Resultaten, welche in Tabelle VI angegeben sind, ist klar ersichtlich, dass man in stark saurem Medium Gallensäuren vollkommen vermisste, trotzdem sie in alkalischem Medium etwas zu bestimmen waren. Die vorangehende Voraussetzung lässt sich zwar teilweise als richtig beweisen, aber die Resultate waren noch sehr entfernt von unserer Erwartung; denn sogar in einem alkalischen Medium wie pH 10,69 haben wir 80% der Gallensäuren vermisst. Aus diesen Ergebnissen kann man annehmen, dass man durch die elektrische Ladung allein die Adsorption der Gallensäuren an Kohle nicht vollständig verhüten kann.

B. *Die Dielektrizitätskonstante des Mediums.* Weiter haben wir neben der elektrischen Ladung die Adsorption der Gallensäuren an Kohle vom Standpunkt der Dielektrizitätskonstante der Medien betrachtet. Wenn man zwei elektrisch geladene Körper in einem Medium annimmt, so lässt sich die elektrische Kraft (f) zwischen beiden Körpern mit folgender Gleichung ausdrücken:

$$f = \frac{e e'}{D r^2}$$

wobei e , e' die Elektrizitätsmenge der elektrisch geladenen zwei Körper, r die Entfernung der beiden Körper und D die Dielektrizitätskonstante des Mediums (D. K.) bedeutet. Wenn beide Körper ungleichnamig geladen sind, so bedeutet f die Anziehungskraft, im Gegenteil bei gleichnamiger Ladung die Abstossungskraft. Weil wir in stark alkalischem Medium arbeiteten, bedeutet bei uns f die Abstossungskraft zwischen Gallensäuren und Kohle. Wenn f sehr gross ist, so wird die Adsorption der Gallensäuren an Kohle gehemmt. Um f möglichst gross zu machen, muss man D möglichst klein wählen. Nun sind die D. K., für Luft 1 vorausgesetzt, für Wasser 81, für Glycerin 56,2, für Methylalkohol 35,4, für Aceton 21, für Phenol 9,7, für Essigsäure 9,7, für Chloroform 5,1, für Äthyläther 4,34, für Benzol 2,29. Unter diesen Substanzen ist die Alkoholreihe am bequemsten zu behandeln, und unter der Alkoholgruppe ist die D. K. um so kleiner, je länger die C-Kette ist; z. B. für Methylalkohol 35,4, für Äthylalkohol 25,4, für Propylalkohol 22, für Butylalkohol 19,2, für Amylalkohol 16,7. Andererseits nimmt nach der Traubeschen Regel die Oberflächenaktivität unter dieser homologen Reihe mit der C-Kette parallel zu. Nun haben wir Äthylalkohol gewählt; denn er löst die Gallensäuren sehr leicht auf und ist schon lange von vielen Forschern, wie auch von Nakagawa, bei der Gallensäurenextraktion angewandt worden, obwohl seine D. K. unter der Alkoholgruppe nicht die kleinste ist.

Wenn man also statt des Wassers Äthylalkohol anwendet, so könnte man erwarten, dass einerseits die Gallensäuren und die

Kohle durch die verminderte D. K. des Mediums immer stärker von einander abgestossen werden, und dass anderseits der oberflächenaktive Alkohol an der Tierkohle adsorbiert wird, woraus resultiert, dass die Adsorption der Gallensäuren verdrängt wird. In der Tat konnten wir experimentell in einem mit Alkohol bearbeiteten Falle bei pH 10,21 100% der Gallensäuren extrahieren.

Nun ist wieder zu untersuchen, wie sich Tierkohle und Gallensäuren in alkoholischem Medium verhalten.

TABELLE VII.

5 ccm Alkohol+5 ccm Phosphatgemisch+2 g Kohle 1 Stunde
lang geschüttelt und filtriert.

pH gemessen		
Ohne Kohle	mit Kohle	Differenz
2,74	2,81	- 0,03
3,01	2,91	+ 0,09
3,68	3,15	+ 0,53
4,81	3,30	+ 1,51
5,61	3,37	+ 2,23
5,95	3,43	+ 2,50
6,88	3,53	+ 3,35
7,73	3,90	+ 3,83
8,72	4,83	+ 3,89

Wie aus Tabelle VII ersichtlich ist, verschiebt sich der I. P. der Kohle in 50%igem Alkohol stark nach der sauren Seite und liegt etwa in der Nähe von pH 2,85. Die Stabilität der Kohle verschiebt sich in 80%igem Alkohol ebenfalls nach der sauren Seite. (Tabelle VIII).

TABELLE VIII.

2 ccm HCl bzw. NaOH von verschiedener Konzentration
+ 8 ccm Alkohol + 20 mgm Kohle.

pH	5,78	6,07	6,34	6,60	7,72	8,56	9,06
Trübung n. 2 Std.	—	—	+	+	+	+	—
Trübung d. Filtrats	—	—	+	+	+	+	—

Was die Gallensäuren anbelangt, so ist von Michaelis und Mizutani (1925) bestätigt worden, dass sich die Dissoziationskonstanten der schwachen Säuren allgemein in alkoholischem Medium nach der alkalischen Seite verschieben; daraus kann man vermuten, dass auch die Gallensäuren als schwache Säuren ihre Dissoziationskonstante im alkoholischen Medium nach der alkalischeren Seite verschieben wie im wässrigen Medium. Mit anderen Worten: es ist notwendig, um die Gallensäuren im alkoholischen Medium möglichst vollkommen dissoziieren zu lassen, sie stärker alkalisch zu machen als im wässrigen Milieu.

Um den Einfluss der Konzentration des Äthylalkohols auf die Extraktion der Gallensäuren zu bestätigen, haben wir weiter in der Weise gearbeitet, wie in Tabelle IX skizziert.

Es zeigte sich, dass je konzentrierter der Alkohol ist, und je alkalischer das Medium reagiert, desto mehr Gallensäure extrahiert werden kann. Und endlich kann man annehmen, dass bei einer Konzentration des Alkohols über ungefähr 85% und bei einer Reaktion über pH 10 die Gallensäuren praktisch vollkommen extrahiert werden können. Diese Bedingungen sind bei der Nakagawaschen Extraktionsmethode völlig erfüllt.

3. *Adsorption des Bilirubins an Kohle.* Als zweite Bedingung, um die Gallensäuren für die kolorimetrische Untersuchung zu extrahieren, muss man die Gallenfarbstoffe vollkommen an Kohle adsorbieren lassen. Das Bilirubin ist, wie oben angegeben, im

TABELLE IX.

0,5 ccm 97,2 mgm% Na. glycocholicum-Lösung + Ammoniak und Alkohol
in wechselnder Menge + 20 mgm Kohle. + Aq. dest. ad 10 ccm.

Alkohol (ccm)	pH gemessen	Gefunden	
		mg%	%
—	6,20	27,9	28,6
	9,73	28,8	29,6
	10,48	28,2	29,0
5,0	6,75	45,9	47,2
	10,20	60,8	62,6
7,5	6,76	60,5	62,2
	9,49	84,0	86,5
	10,05	86,4	89,0

TABELLE X.

0,5 ccm 97,2 mgm% Na. Glykocolatlösung + 9 ccm Alkohol + NaOH
bzw. HCl in verschied. Konzentration + 20 mgm Kohle
+ 0.1 ccm 3 n NaCl + Aq. dest. ad 10 ccm

pH	Na. glycocholicum gefunden	
	in mgm %	in %
2,18	50,2	51,7
3,53	51,2	52,7
6,17	58,8	60,5
7,75	79,5	81,8
8,79	89,4	92,0
9,97	95,2	98,0
12,27	96,6	99,4

wässerigen Milieu als zweibasische schwache Säure giltig, deren Dissoziationskonstante zwischen pK 7–8 liegt. Im alkoholischen Medium soll sie sich nach Michaelis und Mizutani (1925) nach der alkalischen Seite verschieben. Wir sind nun, um zu sehen,

bei welchem pH die Galle am besten entfärbt wird, in der Weise vorgegangen, dass wir zur Galle in alkoholischem Medium und in verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen bestimmte Mengen von Kohle zusetzten, 30 Sekunden im Wasserbade erwärmten, filtrierten und die Farbennuance verglichen.

TABELLE XI.

0,5 ccm Galle + 9 ccm Alkohol + 0,2 ccm gesättigte NaCl + NaOH
+ Aq. auf 10 ccm + 30 mgm Kohle, gekocht und filtriert.

Nr.	pH	Farbe d. Filtrate
1	6,45	farblos
2	8,37	„
3	10,12	„
4	10,85	„
5	12,20	sehr schwach gelblich
6	13,22	schwach gelb
7	13,78	schwach gelb
8	14,05	gelb
9	14,40	gelb

Wie aus Tabelle XI ersichtlich, wird die Galle unterhalb von pH 10,85 vollkommen entfärbt; jedoch fiel die Entfärbung oberhalb von pH 12,20 unvollkommen aus.

Wenn man die oben erhaltenen Resultate zusammenfasst, so ergibt sich, dass, um Gallensäuren aus der Galle für die kolorimetrische Bestimmung zu extrahieren, folgende Bedingungen unbedingt erfüllt sein müssen:

1. Für vollständige Extraktion der Gallensäuren bei Gegenwart von Kohle und von Alkohol muss man das Medium stark alkalisch machen, mindestens über pH 10.

2. Für die vollkommene Entfärbung der Galle bei Gegenwart von Kohle und Alkohol darf man das Medium nicht stärker alkalisch machen als pH 11.

3. Die Konzentration des Alkohols muss mindestens über 85% betragen.

In anderen Worten: für unseren Zweck ist die einzige und alleinige Bedingung, in einem stark alkoholischen Medium zwischen pH 10–11 zu arbeiten. Bei der Nakagawaschen Extraktionsmethode sind diese Bedingungen völlig erfüllt.

IV. EPIKRISE.

Der eine von uns (Nakagawa, 1930) hat eine Extraktionsmethode der Gallensäuren aus der Galle für die kolorimetrische Bestimmung ausgearbeitet. Man verfährt in der Weise, dass man Galle in stark ammoniakalischem und hochkonzentriertem alkoholischen Medium mit Tierkohle vollkommen entfärbt. Bei dieser Methode konnten wir empirisch feststellen, dass die Gallensäuren sogar bei Gegenwart von Kohle praktisch ohne Verlust extrahiert werden können. In vorliegender Arbeit haben wir nun feststellen können, dass das Medium stark alkalisch und zwar alkalischer als mindestens pH 10 reagieren sollte.

Es war lange Zeit allgemein angenommen, dass sich die Gallensäuren bei Gegenwart von Kohle sogar mit Alkohol nicht quantitativ extrahieren lassen, und dass die Kohle deshalb bei der quantitativen Bestimmung der Gallensäuren gar nicht in Betracht kommt. Trotzdem gelang es uns, wie oben beschrieben, eine vollkommene Extraktionsmethode auszuarbeiten. Warum, dies haben wir in dieser Arbeit theoretisch und experimentell zu erklären versucht.

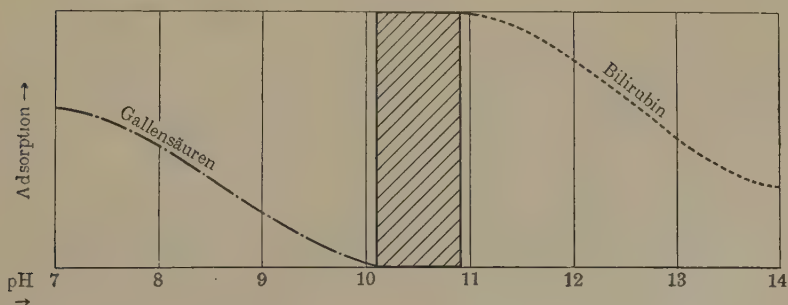
Wenn wir zuerst vom Standpunkt der elektrischen Ladung der Kohle und der Gallensäuren an die Frage herangingen, so konnten wir nachweisen, dass in stark saurem wässrigem Medium, wo Kohle positiv und Gallensäuren negativ geladen sind, die Adsorption der Gallensäuren sehr hochgradig ist, und weiter, dass der Verlust der Gallensäuren sogar in einem alkalischen Medium, wo Kohle und Gallensäuren negativ geladen sein müssen, noch so gross ist, dass von einer quantitativen Bestimmung gar nicht die Rede sein kann. Hieraus ergibt sich, dass die Adsorption der Gallensäuren an Kohle

im wässrigen Medium durch die elektrische Ladung allein nicht vollkommen verhütet werden kann.

Dann haben wir ein alkoholisches Medium versucht; denn die D. K. des Äthylalkohols ist viel kleiner als die des Wassers, und Äthylalkohol löst Gallensäuren sehr leicht auf. In alkoholischem Medium erhält man um so bessere Resultate, je konzentrierter der Alkohol ist, bis sich endlich die Gallensäuren in einem Medium über pH 10 ohne Verlust extrahieren lassen. Dies kommt wahrscheinlich erstens daher, dass Gallensäuren in solchem alkoholischen und alkalischen Medium negativ geladen sind wie Kohle, und zweitens daher, dass die Adsorption der Gallensäuren an die Kohle wegen der kleinen D. K. des Äthylalkohols verdrängt wird, schliesslich drittens daher, dass der Äthylalkohol Gallensäuren sehr leicht auflöst.

Was die Entfärbung der Galle anbelangt, so haben wir bestätigen können, dass sich das Bilirubin *ceteris paribus* in einem Medium unterhalb pH 11 vollkommen, aber oberhalb pH 12,4 nicht vollkommen adsorbieren lässt.

Abbildung 3.



Diese Ergebnisse kann man so zusammenfassen: Für die vollkommene Extraktion der Gallensäuren muss man unbedingt in einem stark alkoholischen und alkalischen Medium oberhalb von pH 10, und für die völlige Entfärbung der Galle mittelst Kohle in einem Medium unterhalb von pH 11 arbeiten: in anderen Worten:

nur ein Medium zwischen pH 10–11 ist zum Arbeiten geeignet. Diese kleine Differenz von pH hält den Schlüssel für die Lösung des Rätsels der Gallensäurenextraktion aus der Galle, wie man aus der nebenstehenden Abbildung leicht versteht. Da wir bei der Nakagawaschen Extraktionsmethode immer in einem Medium von pH 10,2–10,6 gearbeitet haben, wie in Kapitel II dargestellt ist, glauben wir, dass wir aus obigen Tatsachen die Nakagawasche Extraktionsmethode haben theoretisch erklären können.

V. SCHLUSSFOLGERUNG.

1. Die Adsorption der Gallensäuren an Tierkohle wird durch gleichnamige elektrische Ladung allein nicht vollkommen verhütet. In alkoholischem Medium wird die Adsorption aber sehr stark verdrängt. Die völlige Extraktion der Gallensäuren bei Gegenwart von Tierkohle erfolgt ohne Verlust in einem hoch konzentrierten alkoholischen Medium (mindestens über 85%), das gleichzeitig stark alkalisch über pH 10 ist.

2. Für die vollkommene Entfärbung der Galle mit Kohle ist man genötigt, in einem schwächer alkalischen Medium als pH 11 zu arbeiten.

3. Um die Galle mit Kohle völlig zu entfärben und zugleich die Gallensäuren quantitativ zu extrahieren, ist es unbedingt notwendig, sie in einem hochkonzentrierten alkoholischen und stark alkalischen Medium zwischen pH 10–11 zu behandeln.

4. Bei der Nakagawaschen Extraktionsmethode ist Alkohol in genügender Konzentration gebraucht, und das Medium immer mit Ammoniak zwischen pH 10,2–10,6 erhalten. Die obengenannten Bedingungen sind hierbei völlig erfüllt, und die Nakagawasche Extraktionsmethode hat jetzt ihre theoretische Grundlage und Erklärung erhalten.

LITERATUR.

- Bondi (1907): Zs. f. physiol Chem., **53**, 8.
Charlet, Marie (1929): J. Biol. Chem., **210**, 42.
Fischer (1927): Lehrbuch d. physiol. und pathol. Chem. von Otto Fürth
Gregory and Pascoe (1929): J. Biol. Chem., **83**, 35.
Kolthoff (1926): Bioch. Zs., **168**, 122.
Keeser (1923): Biochem. Zs., **138**, 176.
Küster: Abderhaldens Handbuch der biol. Arbeitsmethoden, Abt. I. Teil
8, 331.
Michaelis: Die Wasserstoffionenkonzentration.
Michaelis und Mizutani (1925): Zs. f. physikalisch Chem., **116**, 135
Nakagawa, S., Kumekawa, H. und Gondaira, T. (1930): Hokkai-
doigakuzasshi, 8. Jg., Nr. 1.
Nakagawa, S. und Fujikawa, H. (1930): J. of Biochemistry, **12**, 399.
Ogawa: Zs. f. die japanische innermedizinische Gesellschaft (Japanisch)
16, 798.
Rona und v. Töth (1929): Biochem. Zs., **64**, 288.
Wit (1926): Bioch Zs., **207**, 141.

ZUR KENNTNIS DER VERGLEICHENDEN BIOCHEMIE.

VIII. Über das Verhalten einiger heterocarbocyclischen Verbindungen im Froschorganismus.

VON

KENZO KUSUI.

(Aus dem biochemischen Institut der medizinischen Fakultät in Nagasaki.
Vorstand: Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 22. Januar 1931)

In Anbetracht dessen, dass die Organisationsanlage bei den verschiedenen tierischen Körpern jeweils eine besondere ist, sind auch die Wege, die zur Erzielung der einzelnen für den Betrieb notwendigen Vorgänge bei den verschiedenen Organismen eingeschlagen werden, nicht immer dieselben. So ist auch der Entgiftungsvorgang bei den verschiedenen Tieren sehr mannigfaltig.

Trotz der Fülle der Beobachtungen über den anatomischen Bau des Frosches und trotz der häufigen Verwendungen dieses Tieres zur Entscheidung mancher physiologischen und pharmakologischen Fragen erfuhr der Vorgang der Entfernung überschüssiger und schädlicher Stoffe im Froschorganismus bisher wenig Beachtung.

Bunge und Schmiedeberg (1877) stellten zum ersten Mal fest, dass die Benzoessäure im Organismus des Frosches in Hippursäure verwandelt wird. In Übereinstimmung mit der Beobachtung von His (1887) beim Hunde haben die Untersuchungen von K. Mayeda und M. Ogata (1914) ergeben, dass nach Verabreichung von Pyridin an Frösche Methylpyridylammoniumhydroxyd im Harn auftritt. Dann ging Y. Sendju (1926) dazu über, einige Pyridinderivate, welche eine Seitenkette besitzen, auf ihr Verhalten in demselben Organismus zu prüfen. Er hat im hiesigen Institut festgestellt, dass das Picolin und die Picolinsäure in die α -Pyridinursäure umgewandelt werden.

Im Anschluss an diese Beobachtungen habe ich mir auf Veranlassung von Herrn Prof. Tomita die Aufgabe gestellt, das Verhalten von einigen biologisch wichtigen heterocarboeyclischen Verbindungen im Froschorganismus zu untersuchen, welche in ihrem chemischen Verhalten sehr grosse Aehnlichkeit haben und als Zersetzungsprodukte bzw. als Stammsubstanzen vieler Alkaloide angesehen werden können.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

1. *Verabreichung von Nikotinsäure.*

Reine Nikotinsäure wurde den Fröschen als Natriumsalz in Dosen von 0,035 g per Kopf in 10%iger Lösung subkutan injiziert. Der gesammelte Harn wurde in schwach saurer Reaktion auf dem Wasserbad zu Sirup eingedampft und dann mit heissem Methylalkohol aufgenommen. Das Filtrat wurde durch Abdunsten von Methylalkohol befreit, mit 5%iger Schwefelsäure aufgenommen und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Nach einigen Tagen wurde die voluminöse Fällung auf bekannte Weise durch Behandlung mit Baryt und Kohlensäure in eine kohlensaure Lösung verwandelt. Nach dem Einengen wurde diese Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert. Dabei schied sich ein weisser kristallinischer Körper aus, der bei 227°C schmolz. Durch die nachfolgende Analyse wird zweifellos nachgewiesen, dass wir es mit der unverändert ausgeschiedenen Nikotinsäure zu tun haben. Im ganzen wurden 38,6 g Nikotinsäure verabreicht, und die wiedergefundene Menge betrug 6,23 g.

0,1678 g Substanz gaben 0,3606 g CO₂ und 0,0634 g H₂O.

Berechnet für C ₆ H ₅ NO ₂ :		Gefunden:
C	58,53%	58,60%
H	4,06%	4,22%

In der von Nikotinsäure abfiltrierten Lösung konnte ich weder Nikotinursäure noch Trigonellin auffinden. Das physiologische Schicksal der Nikotinsäure im Froschorganismus ist demnach

ähnlich dem, das Komori und Sendju (1926) bei Vögeln beobachtet haben, nämlich dass die Säure unverändert den Organismus verlässt.

2. Verabreichung von Isochinolin.

6000 Fröschen wurde je 0,003g Isochinolin in 10% iger Lösung in Olivenöl subkutan injiziert. Die Menge des Harns der lebenden 4807 Frösche betrug innerhalb von 24 Stunden 52250 ccm. Der Harn wurde mit Bleiessig und Ammoniak gefällt und filtriert. Das Filtrat und Waschwasser wurden mit Schwefelwasserstoff entbleit. Das Filtrat von Bleisulfid wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und mit Kaliumquecksilberjodidlösung versetzt, und zwar so lange, bis kein gelblicher Niederschlag mehr ausfiel. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag unter Zusatz von Schwefelsäure durch frisch gefälltes Silberoxyd zersetzt. Das Filtrat von Jodsilber wurde durch Barytwasser von überschüssiger Schwefelsäure wie Silbersulfat betreibt, der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure und leichtes Erwärmen entfernt.

Die wässrige, alkalische Lösung wurde mit Salzsäure genau neutralisiert, unter vermindertem Druck eingedampft und mit Alkohol extrahiert. Nach wiederholtem Ausziehen mit Alkohol und wiederholtem Eindampfen wurde der sirupöse, bräunlich gefärbte Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen und aus dieser alkoholischen Lösung wurde der gelbweissliche Niederschlag durch alkoholische Platinechloridlösung gefällt. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus heissem Wasser bekam ich das Platindoppelsalz in Form von orangeroten, nadelförmigen Kristallen. Es wog exsiccator trocken 0,37 g, schmolz bei 234°C und zeigte bei der Mischprobe mit der beim Fütterungsversuche an Hunden isolierten analysenreinen Substanz keine Schmelzpunktdepression.

Zur Analyse wurden die Kristalle bei 110°C getrocknet.

0,1012 g Substanz ergaben 0,0284 g Pt.

Berechnet für $(C_{10}H_{10}N.Cl)_2Pt.Cl_4$: Gefunden:

Pt	28,03%	28,06%
----	--------	--------

Aus diesem Versuche geht hervor, dass Isochinolin wie Pyridin im Organismus von Fröschen, wenn auch in viel geringeren Mengen, in die methylierte Verbindung übergeführt wird.

3. Verabreichung von Chinolin.

6170 Frösche erhielten je 0,004 g Chinolin in 10%iger Lösung in Olivenöl subkutan injiziert. Der Harn wurde auf gleiche Weise wie beim Versuch von Isochinolinfütterung behandelt und auf Methylchinoliniumammoniumhydroxyd verarbeitet. Aus 56200 ccm Harn, den 4125 lebende Tiere 24 Stunden nach der Chinolininjektion geliefert hatten, wurden 0,44 g Platinchloriddoppelasalz dargestellt. Es schmolz scharf bei 252°C. Das entspricht, als freie Ammoniumbase berechnet, 1,23% des verabreichten Chinolins.

0,1182 g Substanz ergaben 0,0334 Pt.

Berechnet für $(C_{10}H_{10}N.Cl)_2Pt.Cl_4$: Gefunden:

Pt	28,03%	28,25%
----	--------	--------

Es unterliegt keinem Zweifel, dass die hier erhaltene Verbindung mit dem Methylchinoliniumammoniumhydroxyl identisch war.

4. Verabreichung von Chinaldin.

4439 Fröschen wurde Chinaldin als 10%ige Lösung in Olivenöl in einmaligen Dosen von 0,005 g per Kopf subkutan eingespritzt. Der gesammelte Harn von 3562 lebenden Fröschen wurde auf dem Wasserbad eingedampft und mit 94%igem Alkohol aufgenommen. Der Alkoholextrakt wurde wiederum eingedampft, nochmals mit absolutem Alkohol ausgezogen, die vereinigten Auszüge abdestilliert, der Rückstand in 5%iger Schwefelsäure gelöst und mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Niederschlag wurde auf die bekannte Weise mit Baryt zerlegt, der Überschuss an Baryt durch Kohlensäure entfernt. Das Filtrat wurde dann unter vermindertem Druck stark eingeeengt. Beim Ansäuern mit Schwefelsäure schied sich daraus ein kristallinischer Körper aus (2,1 g). Nach dem Umkristallisieren aus heissem Wasser schmolz die Substanz bei 290°C (unkorr.). Sie ergibt mit Barytwasser keine Fällung.

0,1514 g Substanz gaben 0,1956 g CO_2 und 0,0990 g H_2O .

0,1384 g Substanz gaben 36,9 ccm. N_2 (21,7°C, 762 mm.).

Gefunden: C 35,23% H 7,31% N 30,16%

Die chemische Konstitution dieser Verbindung ist noch nicht aufgeklärt.

Die von dem kristallinen Körper abfiltrierte schwefelsaure Lösung wurde im Kumagawa-Sutoschen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abgedunstet, in wenig Wasser gelöst und dann mit Bariumcarbonat versetzt. Aus dem Filtrat schied sich ein weisser drusenförmiger kristallinischer Körper aus (0,3 g). Die Kristalle wurden aus heissem Wasser mit wenig Tierkohle umkristallisiert.

0,1362 g Substanz (bei 160°C getrocknet) gaben 0,0648 g BaSO_4 .

Berechnet für $(\text{C}_{10}\text{H}_6\text{NO}_2)_2\text{Ba}$:

Gefunden:

Ba 28,48%

27,93%

Die Analyse ergab einen Wert, der mit dem des chinolincarbonsauren Bariums beinahe übereinstimmt. Genauere Untersuchungen zur Identifizierung der Substanz konnten ihrer zu kleinen Menge wegen nicht gemacht werden. Unentschieden bleibt dabei, ob der Froschorganismus die Oxydation der Methylgruppe des Chinaldins herbeiführen kann, oder ob sich das verabfolgte Chinaldin zum Teil in Chinolincarbonsäure verwandelt, welche dann aber vollständig gespalten würde. Zur Klärung dieser Fragen wurden die folgenden Versuche angestellt.

5. Verabreichung von α -Chinolincarbonsäure.

Zur Darstellung der α -Chinolincarbonsäure wurde nach Königs (1899) das Chinaldin mit Formaldehyd im Einschmelzrohr zu α -Chinolypropandiol kondensiert, und diese Verbindung durch konzentrierte Salpetersäure oxydiert.

1490 Fröschen wurde je 0,007–0,01 g α -Chinolincarbonsäure als Natriumsalz in 10%iger Lösung subkutan beigebracht. Der gesammelte Harn der 1327 lebenden Tiere wurde auf dem Wasserbad eingedampft und mit heissem Alkohol ausgezogen. Der nach

Abdampfen des Alkohols erhaltene Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, die wässrige Lösung mit Schwefelsäure angesäuert und mittels des Kumagawa-Sutoschen Flüssigkeits-extraktors mit Äther erschöpfend extrahiert. Beim Abdampfen der ätherischen Auszüge schieden sich nadelförmige Kristalle aus. Die gereinigte Substanz wog trocken 3,2 g. Sie löst sich schwer in Äther, leicht in Alkohol und Wasser. F. 156°C .

0,1602 g Substanz gaben 0,4072 g CO_2 und 0,0561 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_2$:

Gefunden:

C 69,34%

69,32%

H 4,07%

3,91%

Die Substanz erwies sich also als unveränderte α -Chinolin-carbonsäure.

Die mit Äther extrahierte ursprüngliche schwefelsaure Lösung wurde mit Schwefelsäure so lange versetzt, bis die Lösung 5% davon enthielt, und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mehrmals mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, mit Baryt zerlegt, auf freier Flamme gekocht und heiss filtriert. Der überschüssige Baryt wurde mit Kohlensäure entfernt, das von Bariumcarbonat abfiltrierte Filtrat eingeeengt, mit Schwefelsäure angesäuert und dann mit Äther erschöpfend extrahiert. Beim Abdestillieren des ätherischen Extraktes schieden sich nadelförmige Kristalle aus (0,07 g). Nach dem Umkristallisieren aus kochendem Wasser schmolz die Substanz bei 156°C und es zeigte sich bei der Mischprobe mit der oben erhaltenen Chinolin-carbonsäure keine Schmelzpunktdepression.

Die Gesamtausbeute der wiedergefundenen Chinolincarbonsäure betrug mithin ca. 30% der verabreichten.

Im Vergleich zur Chinaldinfütterung ist die Menge der gefundenen Chinolincarbonsäure recht gross. Es ergibt sich daraus, dass der Froschorganismus die Oxydation der Methylgruppe des Chinaldins nur in geringem Mass herbeiführen kann. Die Glykokollpaarung nach Verfütterung von Chinolincarbonsäure bleibt im Froschorganismus ganz aus.

6. Verabreichung von α -Chinolylpropandiol.

In vitro wird das α -Chinolylpropandiol durch konzentrierte Salpetersäure sehr leicht in die α -Chinolincarbonsäure oxydiert. Im Froschorganismus war diese Fähigkeit nicht beobachtet.

930 Frösche erhielten je 0,01 g α -Chinolylpropandiol als schwach salzsaure wässrige Lösung subkutan.

In der Erwartung, dass als Umwandlungsprodukt entweder α -Chinolincarbonsäure im Harn ausgeschieden wird oder die verabreichte Substanz zum Teil unverändert wiedergefunden werden kann, habe ich die Harnbearbeitung nach allen Fraktionen getrennt ausgeführt. Weder α -Chinolincarbonsäure noch Chinolylpropandiol konnte ich dabei isolieren.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Nikotinsäure verlässt zum Teil unverändert den Organismus des Frosches.

2. Der Frosch ist befähigt, wenn auch in geringeren Mengen, verfüttertes Chinolin und Isochinolin in die Methylverbindungen überzuführen.

3. Das Chinaldin wird im Froschorganismus durch Oxydation nur in geringem Mass in Chinaldinsäure umgewandelt.

4. Die α -Chinolincarbonsäure verhält sich dabei ganz anders wie die Picolinsäure, indem sie nicht in eine mit Glykokoll gepaarte, der Pyrindinursäure analoge Verbindung übergeführt, sondern in beträchtlicher Menge unverändert im Harn ausgeschieden wird.

5. Im Organismus des Frosches wird die Fähigkeit, das α -Chinolylpropandiol in die Chinaldinsäure zu oxydieren, nicht beobachtet, während in vitro diese Reaktion sehr leicht erfolgt.

LITERATURE.

von Bunge, G. und Schmiedeberg, O. (1877): Arch. f. exp. Path., 6, 233.

His, W. (1887): Arch. f. exp. Path., 22, 253.

Komori, Y. u. Sendju, Y. (1926): J. or Biochem., **6**, 163.

Königs, W. (1899): Ber. d. chem. Ges., **32**, 223.

Mayeda, K. u. Ogata, M. (1914): H-S. **89**, 251.

Sendju, Y. (1927): J. of Biochem., **7**, 273.

ÜBER DEN EINFLUSS DER NARKOTICA AUF DIE ZUCKERAUSSCHIEDUNGSSCHWELLE.

VON

YOSHIO IWANAGA.

*(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. R. Inada der
kaiserlichen Universität zu Tokio.)*

(Eingegangen am 28. Januar 1931)

In unserer Klinik wurde die Wirkung der vegetativen Reizgifte und der Einfluss der Vagus- und Splanchnikusdurchschneidung auf die Zuckerausscheidungsschwelle schon wiederholt untersucht, (Nakayama 1924, Shim 1925, Eda 1927, Kawashima 1928, Kawashima und Iwanaga 1930). Was die Lähmungsgifte anbetrifft, hat Eda (1929) nachgewiesen, dass das sympathikuslähmende Ergotamin die abnorm erhöhte Zuckerausscheidungsschwelle herunderdrückt, obwohl das Gift auf den normalen Schwellenwert keinen sichtbaren Einfluss ausübt. Das vaguslähmende Atropin wirkt dagegen gar nicht erniedrigend auf die Schwelle, sogar eher, besonders bei grösserer Gabe, erhöhend, was wohl auf der zentralen Sympathikusreizung des Giftes beruht (Shim 1925, Eda 1927). Es sollte daher auch von gewisser Bedeutung sein, den Einfluss der zentrallähmenden narkotischen Mittel auf den Schwellenwert zu studieren. So habe ich auf Veranlassung und unter der Leitung der Herren Prof. Dr. R. Inada und Prof. Dr. K. Sakaguchi diese Frage aufgenommen.

Bei meinen Untersuchungen ging ich so vor, dass ich als Versuchstiere gutgenährte Hunde von 10–15 Kg. Körpergewicht und als Narkotica Morphin, Chloroform, Äther, Alkohol und Scopolamin gebrauchte. Der Blutzucker wurde nach Hagedorn-Jensen und der Harnzucker nach Pavy-Kumagawa-Suto bestimmt.

VERSUCH MIT MORPHIN.

Dass das Morphin den Blutzuckergehalt deutlich erhöht und

Glykosurie hervorruft, wurde schon von vielen Seiten mitgeteilt (Kobayashi 1927, Noma und Fujii 1926, Kikuna 1927, Miyasaki 1927, Nikolaus und Förster 1924, Luzzato 1904, Marenzi 1926, u. a.). Aber über den Einfluss des Giftes auf die Zuckerausscheidungsschwelle gibt es wenigstens meines Wissens keine Untersuchung. Bei meinen Untersuchungen habe ich zuerst dem Versuchstiere Traubenzucker in lauwarmem Wasser gelöst mit Gummischlauch in den Magen eingeführt, wodurch eine leichte Glykosurie hervorgerufen wurde. Dann wurde demselben Tiere Morphinum hydrochloricum als zwei Proz. Lösung so viel subkutan injiziert, dass die Glykosurie ebenso in Spuren auftrat oder schwach positiv ausfiel. In allen diesen Versuchen wurde der Blutzuckergehalt halbstündlich und der Harnzucker stündlich serienweise untersucht, um die Zuckerausscheidungsschwelle daraus zu ermitteln. (Versuchsanordnung A.). Weil die zur Erzeugung der leichten Glykosurie genügende kleine Gabe Morphin auf den Schwellenwert keinen sichtbaren Einfluss ausübte, so habe ich in zweiter Versuchsreihe (Versuchsanordnung B.) die Morphinmenge stark vergrößert, sodass das Tier dadurch deutlich betäubt wurde, und eine starke Hyperglykämie mit deutlicher Glykosurie dabei zustande kam. Um hier den Einfluss des Giftes auf den Schwellenwert klar zu machen, habe ich in Kontrollversuchen durch Vergrößerung der Zuckerzufuhr eine annähernd gleich starke Hyperglykämie oder Glykosurie erzeugt und die Werte in beiden Versuchsreihen miteinander verglichen. Ausserdem habe ich den Schwellenwert des Hundes durch subkutane Adrenalininjektion künstlich erhöht und dann wieder den Einfluss des Morphins auf die so gesteigerte Schwelle untersucht, weil die Herabsetzung der Schwelle durch verschiedene Momente nach Untersuchungen in unserer Klinik bei einem abnorm gesteigerten Schwellenwerte deutlicher in die Erscheinung tritt, als bei einem normalen (Versuchsanordnung C.). Zu diesem Zwecke wurde die Menge des Morphins wie des Traubenzuckers so gewählt, dass die Glykosurie resp. Hyperglykämie dadurch in gerade vergleichbarer Stärke

hervorgerufen wurde. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle I wiedergegeben.

Wie die Versuchsreihe A in der Tabelle I zeigt, wurde die Zuckerausscheidungsschwelle durch die kleine Menge Morphin fast gar nicht beeinflusst, sodass die Blutzuckersteigerung und die Grösse der Zuckerausscheidung in den Versuchen mit Zucker- und Morphinzufuhr keine Inkongruenz zeigte.

Bei Anwendung einer grösseren Menge des Giftes (Versuchsreihe B) kam die Hyperglykämie und Glykosurie deutlich zustande. Hier war die durch Morphin hervorgerufene Glykosurie bei gleich starker Hyperglykämie unverkennbar stärker als die alimentäre, was beweist, dass eine grosse Menge Morphin hyperglykämisierend und zugleich schwellenerniedrigend wirkt. Bei der Kombination der Adrenalininjektion mit der Morphin-resp. Zuckerzufuhr beobachtet man bei Morphinversuchen eine im Vergleich zur Stärke der Blutzuckersteigerung verhältnismässig hochgradigere Glykosurie als sonst. Ausserdem kann man auch leicht aus der Tabelle ersehen, dass die schwellenerniedrigende Wirkung des Morphins bei der Versuchsreihe C am deutlichsten in die Erscheinung tritt. Hieraus folgt, dass das Gift auf den abnorm gesteigerten Schwellenwert stärker herabsetzend wirkt als auf den normalen.

VERSUCH MIT CHLOROFORM.

Von vielen Seiten (Kikuna 1927, Bertram 1923, Ellison und Davis 1920 u. a.) wurde schon wiederholt mitgeteilt, dass Chloroformierung eine Hyperglykämie resp. Glykosurie hervorruft. Es fehlt aber auch nicht an widersprechenden Angaben (Tokumitsu und Katabuchi 1922) nämlich, dass die Chloroformnarkose eher eine Hypoglykämie verursacht, und dass erst erwähnte Erscheinung nur zu den Ausnahmen gehört. Jedenfalls wurde in allen diesen Arbeiten die Zuckerausscheidungsschwelle fast nicht berücksichtigt, während ich in vorliegender Arbeit darauf besonders acht gab.

TABELLE I.

Hunde Nr.	Versuchs- Anordnung	Datum 1929	Adre- nalin mg	Mor- phin 2% cem	Zuc- ker g	Blutzuckergehalt mg% (Glykosurie %)					
						vor	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	3
Nr. 1. 12.0 kg	A	29. VI.			28	97 (-)	115	122 (-)	100	105 (0.42)	98 (sp)
		29. VII.		0.5		91 (-)	104	114 (sp)	105	92 (sp)	98 (-)
		24. VIII.			155	98 (-)	148	198 (1.90)	205	190 (2.50)	162 (2.55)
	B	6. VII.		2.5		102 (-)	202	166 (3.15)	136	110 (3.15)	102 (-)
		27. IX.	1.0		100	89 (-)	263	303 (5.00)	327	301 (10.40)	262 (7.88)
		30. IX.	"	5.0		90 (-)	188	209 (0.90)	240	258 (11.20)	255 (10.50)
	C	8. X.	"		80	79 (-)	166	197 (sp)	255	240 (2.25)	199 (1.20)
		13. X.	"	"		92 (-)	177	230 (2.00)	250	297 (12.00)	290 (12.88)
	A	25. VI.			30	102 (-)	110	122 (sp)	100	93 (0.50)	98 (0.42)
		17. VII.		0.5		100 (-)	114	112 (-)	118	123 (0.40)	114 (sp)
		20. VII.			180	89 (-)	200	210 (1.83)	202	180 (2.44)	173 (2.70)
Nr. 2. 14.0 kg	B	13. VII.		7.0		82 (-)	190	192 (2.55)	205	189 (3.90)	163 (1.80)
		24. VII.		10.0		89 (-)	210	210 (3.15)	193	183 (3.59)	170 (1.82)
		13. VIII.	1.0	8.0		92 (-)	120	200 (1.00)	218	231 (9.50)	210 (8.50)
	C	17. VIII.	"		50	90 (-)	143	161 (1.85)	186	190 (1.20)	180 (1.20)
		18. VIII.	"		80	91 (-)	140	170 (1.72)	195	212 (2.00)	205 (2.10)
		19. VIII.	"	4.0		100 (-)	167	190 (0.81)	190	172 (2.11)	130 (2.05)
	A	27. VII.		1.0		90 (-)	100	122 (0.42)	122	100 (0.42)	93 (0.50)
		30. VII.			30	88 (-)	125	125 (0.55)	107	98 (0.50)	92 (sp)
		12. VIII.			180	84 (-)	163	203 (1.72)	200	189 (2.50)	187 (1.77)
	B	13. VIII.		10.0		95 (-)	199	205 (2.05)	205	180 (3.55)	151 (5.80)
		19. IX.	1.0	8.0		102 (-)	162	211 (1.80)	218	227 (6.30)	211 (5.88)
		25. IX.	"		80	90 (-)	239	292 (1.83)	313	282 (6.70)	170 (5.00)

TABELLE I. (Continued)

Hunde Nr.	Versuchs- Anordnung	Da- tum 1929	Adre- nalin mg	Mor- phin 2% cem	Zuc- ker g	Blutzuckergehalt mg% (Glykosurie %)					
						vor	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	3
Nr. 4. 10.0 kg	C	12. X.	1.0		40	91 (-)	157	201 (0.66)	248	240 (3.80)	219 (3.00)
		13. X.	"	5.0		88 (-)	145	188 (0.78)	210	254 (7.25)	250 (9.10)
		15. X.	"		40	91 (-)	140	192 (-)	221	220 (2.00)	200 (2.05)
		18. X.	"	5.0		99 (-)	153	177 (0.88)	202	209 (3.20)	200 (3.00)
Nr. 5. 11.5 kg	C	17. X.	"	5.0		88 (-)	157	199 (0.88)	238	250 (8.95)	259 (11.20)
		12. X.	"		48	90 (-)	163	207 (0.77)	263	257 (5.50)	230 (5.00)
		13. X.	"	3.0		90 (-)	130	179 (0.70)	233	246 (6.75)	255 (5.70)
		15. X.	"		40	87 (-)	133	170 (-)	241	240 (3.32)	237 (3.50)

Die Versuchstiere wurden hier zuerst im nüchternen Zustande mit Chloroform narkotisiert, und dabei die Blutzuckeränderung wie die Glykosurie durch serienweise Untersuchung genau studiert. Dann wurde versucht, durch Traubenzuckerdarreichung eine annähernd gleich starke Hyperglykämie oder Glykosurie hervorzurufen, um die Zuckerausscheidungsschwelle in beiden Versuchsreihen miteinander in Vergleich stellen zu können. Wie bei den Morphinversuchen habe ich auch bei diesen Untersuchungen die Adrenalininjektion kombiniert, um den Einfluss der Chloroformnarkose auf den abnorm gesteigerten Schwellenwert kennen zu lernen.

Aus der Tabelle II ersieht man, dass die Glykosurie bei den chloroformierten Hunden gegenüber der Blutzuckersteigerung im allgemeinen verhältnismässig stärker zustande kommt als bei den mit Zucker gefütterten, was darauf hinweist, dass Chloroform nicht nur hyperglykämisierend sondern auch zugleich auf die Zuckerausscheidungsschwelle herabsetzend einwirkt. Diese schwellenerniedrigende Wirkung des Giftes war bei den adrenalinisierten Tieren deutlicher als sonst.

TABELLE II.

Hunde-Nr.	Datum. 1929	Adrenalin mg	Chloroformnecrose	Zucker %	Blutzuckergehalt mg% (Glykosurie %)						
					vor	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	4
Nr. 1. 13.8 kg	10. XII.		mit		92	123	122	125	127	120	
	14.		ohne	30	(-)		(sp)		(0.45)	(0.50)	(0.45)
	15.	1.5	"	"	88	125	129	107	100	90	
	16.	"	"	"	(-)		(sp)		(0.38)	(0.30)	
	"	"	mit	"	88	131	132	158	177	160	(0.80)
	"	"			(-)		(0.25)		(0.75)	(0.89)	(0.80)
	"	"			90	127	130	133	143	149	(0.92)
	"	"			(-)				(0.65)	(0.92)	(0.92)
Nr. 2. 16.2 kg	11.		ohne	50	87	130	138	144	130	109	
	"		mit		(-)		(0.41)		(0.58)	(0.58)	(sp)
	12.				89	117	120	120	123	129	
	"				(-)				(0.37)	(0.48)	(0.45)
	15.	2.0	ohne	35	95	138	147	163	166	160	
	"	"			(-)		(sp)		(0.82)	(0.78)	(0.80)
	16.	"	mit		93	130	137	139	145	145	
	"	"			(-)		(0.55)		(0.70)	(0.85)	(0.90)
Nr. 3. 13.0 kg	17.		ohne	35	87	124	127	108	100	92	
	"				(-)		(-)		(sp)	(sp)	(-)
	18.		mit		88	108	129	137	120	120	
	"				(-)		(-)		(sp)	(sp)	(-)
	23.	1.5	"		95	129	197	148	148	132	
	"	"			(-)		(0.50)		(0.88)	(0.90)	(0.93)
	24.	"	ohne	20	90	129	137	150	155	155	
	"	"			(-)		(-)		(0.53)	(0.55)	(0.50)
Nr. 4. 9.0 kg	17.		"	30	85	120	122	108	100	93	
	"				(-)		(-)		(-)	(-)	(-)
	18.		mit		90	118	127	130	132	130	
	"				(-)		(-)				(0.55)
	21.	1.0	"		95	120	127	136	138	138	
	"	"			(-)		(-)		(0.60)	(0.62)	(0.49)
	23.	"	ohne	20	92	120	137	145	143	138	
	"	"			(-)		(-)		(0.40)	(0.38)	(sp)
Nr. 5. 14.5 kg	19.	1.5	"	40	90	134	150	158	169	160	
	"	"			(-)		(sp)		(0.79)	(1.05)	(0.92)
	21.	"	mit		92	113	128	144	140	142	
	"	"			(-)		(sp)		(0.82)	(0.88)	(0.88)
	23.	2.5	ohne	25	87	129	134	158	162	150	
	"	"			(-)		(sp)		(0.70)	(0.72)	(0.72)
	25.	"	mit		90	119	133	150	148	140	
	"	"			(-)		(0.41)		(1.07)	(1.00)	(0.97)

VERSUCHE MIT ÄTHER.

Viele Autoren (Fujii 1921, Kikuna 1927, Tate und Hirayama 1926, Steinmetzer und Swoboda 1928, Bertram 1923, Ellison 1920, u. a.) haben schon festgestellt, dass Äthernarkose eine Hyperglykämie und Glykosurie verursacht, aber auf die Veränderung der Zuckerausscheidungsschwelle, welche ich zu kennen wünschte, wurde dabei gar nicht geachtet.

In vorliegender Arbeit habe ich zur Ermittlung des Einflusses der Äthernarkose auf die Zuckerschwelle eine Reihe von den vorangehenden ganz ähnlichen Versuchen angestellt. Es sei nur bemerkt, dass ich am Anfang den Hund durch intrapleurale Ätherinjektion narkotisierte, um die gebrauchte Äthermenge genau messen zu können. Weil ich aber dabei fand, dass dieses Verfahren keinen besonderen Vorteil gegenüber der Inhalationsmethode hat, und mein Untersuchungsergebnis nicht direkt mit der gebrauchten Äthermenge, sondern nur mit der Tiefe der Narkose zu tun hat, so habe ich in den späteren Versuchen das Tier durch Inhalation narkotisiert. Bei diesen Äther- wie bei den Chloroformversuchen war ich bemüht, das Tier die ganze Untersuchungszeit hindurch in einen gleichmässig tiefen Narkosezustand zu versetzen. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle III verzeichnet.

Wie aus der Tabelle leicht ersichtlich ist, verursacht die Äthernarkose eine deutliche Hyperglykämie und Glykosurie. Die schwellenerniedrigende Wirkung des Äthers war nicht so auffallend wie die des Morphins. Aber als der Blutzuckergehalt durch Zuckerezufuhr ungefähr so hoch wie bei den Versuchen mit Äthernarkose wurde, trat die Glykosurie nicht immer, doch häufig, und dort stärker als hier auf, was bedeutet, dass die Schwelle durch Äthernarkose auch in gewissem Masse herabgesetzt wird. Diese schwellenerniedrigende Wirkung des Äthers trat bei den Versuchen mit Adrenalininjektion deutlicher in die Erscheinung. Hieraus folgt, dass Äthernarkose den normalen Schwellenwert nur wenig, aber den durch Adrenalin abnorm erhöhten deutlich herabsetzt.

Hunde- Nr	Datum 1929	Adre- nal- mg	Äther- Nar- kose	Glukose cc	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)									
					vor	$\frac{1}{2}$ st	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	4			
Nr. 1 13.0 kg	25. XI 26.	1.5	mit	50	87 (-)	96	156 (0.40)	169	152 (0.82)	135 (1.07)	(1.17)			
	ohne		90 (-)		141	152 (0.55)	159	155 (0.70)	140 (0.77)					
	" XII 3.		mit	40	87 (-)	140	155 (-)	190	207 (2.00)	177 (2.90)		(2.50)		
	"		ohne		91 (-)	139	178 (sp)	228	220 (2.08)	207 (2.00)				
Nr. 2 13.5 kg	27. XI 29.	1.5	"	70	92 (-)	137	158 (0.54)	172	178 (1.27)	170 (1.50)	(1.55)			
	mit		90 (-)		141	150 (0.40)	168	158 (1.50)	142 (1.55)					
	" XII 6.		"	40	87 (-)	132	140	178	199 (2.00)	198 (3.50)		(3.57)		
	"		ohne		89 (-)	131	170 (sp)	205	200 (1.50)	192 (1.50)			190 (1.00)	
Nr. 3 10.0 kg	30. XI 5.	1.0	mit	50	92 (-)	127	153 (-)	188	187 (2.10)	200 (3.05)	(3.55)			
	" XII 6.	ohne	91 (-)		138	170 (sp)	197	197 (0.87)	190 (1.05)					
	" "	mit	50	92 (-)	127	140 (0.70)	156	155 (2.70)	150 (2.90)	(2.00)				
	" "	ohne		87 (-)	147	189 (0.75)	224	218 (1.08)	210 (3.05)					
	Nr. 4 15.0 kg	10. "		1.5	mit	40	95 (-)	120	127 (0.44)		130	135 (0.57)	135 (0.87)	(0.80)
		ohne			87 (-)		127	120 (sp)	129		133 (0.50)	111 (0.50)	(0.52)	
" "		mit	60		92 (-)	130	148 (0.95)	135	120 (0.80)	121 (sp)	(sp)			
" "		ohne			90 (-)	142	144 (0.45)	120	102 (0.40)	100 (0.35)		(1.72)		
" "		mit	50		82 (-)	140	198 (0.57)	198	190 (1.75)	172 (2.00)	(1.72)			
" "		ohne			89 (-)	149	179 (sp)	220	115 (1.52)	200 (1.51)		(1.40)		
Nr. 5 13.2 kg	7. "	1.5		mit	40	91 (-)	127	142 (0.40)	137	146 (1.02)			135 (1.50)	(1.55)
	ohne			87 (-)		128	130 (-)	129	120 (0.46)	115 (0.40)			(0.30)	
	" "		"	40	90 (-)	143	166 (sp)	182	180 (1.00)	171 (1.51)	(1.30)			
	" "		mit		40	87 (-)	128	177 (0.70)	170	175 (1.48)		167 (1.36)	(1.30)	
	" "		"	"		"	"	"	"	"	"	"		"

VERSUCHE MIT ALKOHOL.

Über den Einfluss des Alkohols auf den Blutzuckergehalt wie auf die Glykosurie sind die Angaben der Autoren nicht eindeutig, indem einige (Blatterwick und Maxwell 1920, Hetenyi 1924, u. a.) dabei eine Blutzuckersteigerung resp. eine verstärkte Zuckerausscheidung fanden, während andere (Tsuchiya 1927, Gavrilu und Sparchez 1928) dagegen eher die umgekehrte Erscheinung, oder nur eine unbestimmte Veränderung beobachteten (Masamune 1927, Oppermann 1913, Nitzescu 1927).

Bei meinem Versuche habe ich absoluten Alkohol mit Wasser verdünnt in den leeren Magen des Tieres eingeführt. Weil ich durch einfache Alkoholzufuhr keine Glykosurie hervorrufen konnte, habe ich mit ihr Traubenzuckerdarreichung kombiniert. Die Versuchsanordnung war auch hier im grossen und ganzen wie die vorangehende. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle IV wiedergegeben.

Wie die Tabelle zeigt, konnte ich keinen sichtbaren Einfluss des Alkohols auf den nüchternen Blutzuckerwert und auf die alimentäre Hyperglykämie resp. die durch Kombination von Zucker- und Adrenalinzufuhr erzeugte Blutzuckersteigerung konstatieren. Ebenso war die Wirkung des Alkohols auf die Ausscheidungsschwelle bei einfacher alimentärer Glykosurie nicht nachweisbar. Aber bei Versuchen an vier Hunden, wo Adrenalininjektion kombiniert wurde, habe ich die Herabsetzung des Schwellenwertes durch Alkohol bei einem Tiere (Nr. 1) deutlich, an zwei (Nr. 3 und Nr. 4) nur in Andeutung beobachtet, während sie bei dem vierten (Nr. 2) vermisst wurde. Der Alkohol scheint also auch auf die Zuckerausscheidungsschwelle einen herabsetzenden Einfluss auszuüben. Aber diese Wirkung ist nicht so stark wie bei den anderen von mir geprüften Narkotica und kommt nur gegen abnorm gesteigerten Schwellenwert zutage, während sie gegen den normalen gewöhnlich ganz vermisst wird. Das Alkohol scheint also auch auf die Zuckerausscheidungsschwelle einer herabsetzenden

Hunde- Nr.	Datum 1929	Adre- nal. mg	Absol. Alko- hol cem	Glukose to	Was- ser cem	Blutzucker mg % (Glykosurie %)					
						vor	$\frac{1}{2}$ st	1	$1\frac{1}{2}$	2	3
Nr. 1 11.5 kg	2. X 4.		60		200	107 (—)	104	109 (—)	107	102 (—)	105 (—)
	" 7.		"	40	150	98 (—)	117	135 (—)	135	136 (0.44)	124 (0.55)
	" 10.	1.0	60	60	120	88 (—)	100	125 (—)	139	138 (0.40)	121 (0.40)
	" 20.	"	60	60	240	87 (—)	175	278 (0.98)	280	291 (7.80)	258 (9.50)
	" 12.	"	60	"	180	91 (—)	156	199 (0.52)	239	278 (3.20)	265 (5.55)
	" 17.	"	60	"	"	90 (—)	121	134 (sp)	185	221 (4.30)	229 (5.05)
	"	"	60	30	130	100 (—)	183	200 (0.50)	223	220 (1.58)	205 (1.50)
	"	"	60	30	130	100 (—)	183	200 (0.50)	223	220 (1.58)	205 (1.50)
Nr. 2 12.0 kg	18. XI 27.		60	40	200	91 (—)	129	108 (sp)	88	91 (sp)	91 (—)
	" 22.	1.0	60	"	"	91 (—)	115	110 (—)	108	96 (—)	99 (—)
	" X 39.	"	60	"	180	110 (—)	124	190 (0.45)	190	200 (1.20)	179 (1.00)
	" 24.	"	60	"	"	80 (—)	133	170 (sp)	205	203 (1.05)	192 (1.00)
	" 27.	"	60	"	"	92 (—)	140	153 (0.40)	176	176 (0.77)	136 (0.60)
	"	"	60	30	150	97 (—)	123	158 (sp)	180	182 (0.72)	140 (0.80)
	"	"	60	30	150	97 (—)	123	158 (sp)	180	182 (0.72)	140 (0.80)
	"	"	60	30	150	97 (—)	123	158 (sp)	180	182 (0.72)	140 (0.80)
Nr. 3 10.5 kg	25. VII 1930		60		200	89 (—)	99	101 (—)	100	98 (—)	92 (—)
	" IX 19.		60	40	150	88 (—)	132	128 (0.32)	115	92 (sp)	89 (—)
	" X 28.	1.0	60	"	"	90 (—)	128	135 (sp)	120	109 (0.29)	100 (0.29)
	" 31.	"	60	45	180	82 (—)	149	178 (sp)	215	210 (1.80)	200 (1.00)
	" 3.	"	60	55	200	89 (—)	133	174 (sp)	203	212 (1.12)	200 (2.05)
	" XI 6.	"	60	"	"	95 (—)	154	178 (0.55)	250	241 (3.57)	205 (3.07)
	"	"	60	50	195	89 (—)	120	192 (sp)	237	237 (3.66)	233 (3.50)
	"	"	60	50	195	89 (—)	120	192 (sp)	237	237 (3.66)	233 (3.50)
Nr. 4 16.0 kg	24. VII 1930		80		240	93 (—)	98	88 (—)	88	95 (—)	95 (—)
	" 15. XI		80	50	200	90 (—)	138	120 (0.35)	102	91 (sp)	95 (—)
	" 9. X		80	"	"	92 (—)	130	132 (sp)	127	108 (0.42)	97 (sp)
	"		80	"	"	92 (—)	130	132 (sp)	127	108 (0.42)	97 (sp)

TABELLE IV. (Continued)

Hunde- Nr.	Da- tum 1929	Adre- nal. mg	Absol. Alko- hol ccm	Gul- kose ccm	Was- ser ccm	Blutzucker mg % (Glykosurie %)					
						vor	$\frac{1}{2}$ st	1	$1\frac{1}{2}$	2	3
Nr. 4 16.0 kg	28. X	1.5	85	65	240	89 (-)	129	170 (-)	221	230 (2.00)	209 (2.55)
	31.	"		60	220	87 (-)	139	205 (0.48)	225	255 (1.80)	209 (1.82)
	"	"	85	65	240	90 (-)	134	172 (sp)	204	211 (2.00)	210 (1.75)
	"	"		"	"	92 (-)	147	190 (sp)	208	209 (1.00)	190 (1.05)
	5.	"		"	"						
	XI	"		"	"						

Einfluss auszuüben. Aber diese Wirkung ist nicht so stark wie bei andern von mir geprüften Narkotica und kommt nur gegen abnorm gesteigerten Schwellenwert zutage, während sie gegen den normalen gewöhnlich ganz vermisst wird.

VERSUCH MIT SCOPOLAMIN.

Eda (1927) fand bei drei Kranken mit Parkinsonismus nach Scopolamininjektion eine Herabsetzung* des Schwellenwertes und zugleich eine Besserung der Zuckerassimilation, obwohl die Wirkung beim Diabetiker nicht eindeutig war.

Weil Scopolamin am Menschen bekanntlich narkotisierend wirkt, so stellte ich damit Versuche am Hunde an, ohne die schon im Lehrbuch beschriebene Tatsache zu kennen, dass der Hund gegen Scopolamin sehr widerstandsfähig ist und auch durch eine grosse Dosis Gift nicht leicht narkotisiert, vielmehr eher in Aufregung versetzt wird, was ich auch bei meinen eigenen Versuchen bestätigt finden konnte.

Wie in der Tabelle V angegeben, verhielten sich zwei meine Versuchshunde nach Scopolaminzufuhr ganz ruhig (wie narkotisiert), zwei andere wurden stark erregt. In diesen beiden Gruppen

* Korrektion für Eda's Arbeit mit dem Titel „Einfluss des Atropins und Scopolamins auf die Zuckerausscheidungsschwelle.“ Diese Zeitschr. 1927. 7. 355. Zeile 7.: Statt „eine Erhöhung des Schwellenwertes“ lies „eine Herabsetzung des Schwellenwertes“.

TABELLE V.

Hunde- Nr.	Da- tum 1929	0.2% cem Scopo- lamin	Adre- nalin mg	Gul- kose g	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)						Verhalten d. Tieres nach Sco- polamin
					von	$\frac{1}{2}$ st	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	
Nr. 1 15.0 kg	12. XI	5.0	1.5	35	98 (-)	147	223 (sp)	260	254 (2.00)	217 (5.10)	ruhig
	13.		"	"	92 (-)	158	230 (0.51)	249	245 (2.39)	240 (2.55)	
	"	5.0	"	"	88 (-)	156	183 (sp)	205	238 (1.32)	238 (4.70)	ruhig
	16.		"	"	87 (-)	134	179 (0.41)	240	255 (3.30)	250 (3.30)	
	17.		"	"							
	"										
Nr. 2 12.5 kg	13.		"	30	99 (-)	166	200 (0.50)	223	220 (2.05)	215 (2.09)	aufgeregt
	"	4.0	"	"	92 (-)	127	184 (sp)	200	230 (1.40)	238 (1.88)	
	"		"	"	102 (-)	164	190 (0.45)	198	210 (1.55)	212 (1.55)	aufgeregt
	18.		"	"	89 (-)	132	129 (-)	175	226 (0.85)	227 (1.87)	
	20.	8.0	"	"							
	"										
Nr. 3 15.0 kg	20.		"	35	95 (-)	130	198 (sp)	205	188 (0.95)	192 (0.90)	aufgeregt
	21.	6.0	"	"	100 (-)	127	154 (sp)	188	195 (0.50)	190 (0.70)	
	"		"	"	90 (-)	142	149 (0.42)	199	208 (1.00)	211 (1.70)	aufgeregt
	23.		"	"	92 (-)	127	177 (sp)	208	235 (1.72)	222 (1.70)	
	24.	6.0	"	"							
	"										
Nr. 4 1.30 kg	20.		"	30	88 (-)	140	177 (0.31)	195	212 (1.87)	205 (2.00)	ruhig
	21.	5.0	"	"	89 (-)	124	175 (sp)	210	233 (1.88)	230 (1.92)	
	"		"	"	90 (-)	143	164 (sp)	188	192 (1.05)	189 (1.20)	ruhig
	23.		"	"	92 (-)	129	138 (sp)	178	179 (1.50)	188 (1.52)	
	24.	6.0	"	"							
	"										

der Versuchstiere gingen nun die Untersuchungsergebnisse ganz auseinander. Bei einem ruhigen Tiere (Nr. 1) wurde die Glykosurie nach Adrenalin-Zuckerzufuhr beim Gebrauch von Scopolamin im Vergleiche zu der Höhe der dabei auftretenden Hyperglykämie relativ stärker als bei den Kontrollversuchen, was bedeutet, dass das Gift auf die Schwelle erniedrigend eingewirkt hat. Aber bei einem anderen solchen (Nr. 4) war diese Wirkung nicht deutlich nachweisbar. Bei den aufgeregtten Tieren wurde keine Herabsetzung

des Schwellenwertes beobachtet, sondern eher eine Neigung zur Erhöhung gefunden.

Aus allen oben erwähnten Versuchen stellt sich heraus, dass bei einer tiefen Narkose gewöhnlich eine Erniedrigung der Zuckerausscheidungsschwelle mit Hyperglykämie zustande kommt. Diese schwellenerniedrigende Wirkung der Narkotica war gegen den normalen Schwellenwert nicht sehr auffallend, während sie gegen den durch sympathische Reizung abnorm gesteigerten deutlicher in die Erscheinung trat. Hieraus könnte man wohl vermuten, dass die Herabsetzung der Schwelle durch Narkotica mit der Steigerung der Sympathikotonie immer auffallender wird. In der Tat wurde eine solche Erscheinung bei meinen Untersuchungen häufig gefunden, was man durch genaue Betrachtung der Tabelle leicht ersehen kann. Weil die Reaktion des Organismus gegen Giftwirkung mit der Zeit schwankt, so wurde die Hyperglykämie durch Narkotica, welche nach herrschender Ansicht hauptsächlich durch Sympathikusreizung verursacht wird, trotz denselben Versuchsbedingungen bei wiederholten Untersuchungen häufig verschieden stark gefunden. Wo die Hyperglykämie stärker zustande kam und so eine stärkere Sympathikotonie anzunehmen war, war die Herabsetzung der Schwelle auch auffallender.

EINFLUSS DER NARKOTICA AUF DEN DURCH ACETYLCHOLIN ERHÖHTEN SCHWELLENWERT.

In den oben erwähnten Versuchen wurde festgestellt, dass die schwellenerniedrigende Wirkung der Narkotica auffallender wird, wenn vorher die Schwelle durch Sympathikusreizung mittels Adrenalins künstlich erhöht ist. Weil Acetylcholin durch die zentrale Sympathikusreizung auf den Schwellenwert erhöhend wirkt (Kawashima 1928, Kawashima und Iwanaga 1930, Iwanaga 1930), so liegt der Gedanke nahe, dass man beim Gebrauch dieses Giftes statt Adrenalin eine ähnliche Erscheinung erwarten kann. Das zu beweisen, habe ich an den mit einer gleichen Menge Acetylcholin injizierten Hunden einmal mit Zuckerzufuhr und ein

andermal mit Narkoticis eine annähernd gleich starke Hyperglykämie hervorzurufen versucht. Ich habe dann die Stärken der dabei gefundenen Glykosurie miteinander in Vergleich gestellt, um daraus die Veränderung der Zuckerausscheidungsschwelle zu

TABELLE VI(1).

Hunde-Nr.	Datum 1930	Acetylcholin g	Zucker %	Narkotica	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)					
					vor	$\frac{1}{2}$ st	1	$1\frac{1}{2}$	2	3
Nr. 1 14. kg	25. I	0.4	20		90 (-)	168 (sp)	152 (sp)	120	92 (sp)	93 (-)
	31. „	„	50		92 (-)	188 (1.50)	215 (1.75)	190	142 (1.75)	100 (0.82)
	26. „	„		2% Morphin- lösung 9 ccm	87 (-)	180 (0.83)	173 (0.95)	148	122 (0.95)	107 (0.75)
	10. II	„		„	84 (-)	192 (2.50)	199 (2.50)	200 (4.00)	160 (4.00)	157 (1.05)
	22. „	„		Chloroform- narkose	87 (-)	170 (0.58)	142 (0.58)	138	130 (0.60)	125 (sp)
		„		Äthernar- kose	89 (-)	173 (1.02)	155 (1.02)	140	125 (0.87)	100 (0.52)
	2. III	„								
Nr. 2 18. kg	31. I	0.5	25		89 (-)	160 (sp)	127 (sp)	92	100 (-)	94 (-)
	10. II	„	50		101 (-)	178 (0.56)	150 (0.56)	129	120 (0.50)	103 (-)
	29. I	„		2% Morphin- lösung 10 ccm	103 (-)	157 (0.50)	146 (0.50)	124	126 (0.95)	109 (0.90)
	4. II	„		„	89 (-)	192 (1.00)	188 (1.00)	150	127 (2.20)	120 (0.52)
	19. „	„		Chloroform- narkose	89 (-)	166 (0.90)	157 (0.90)	140	138 (0.98)	125 (sp)
		„		Äthernar- kose	90 (-)	165 (1.25)	157 (1.25)	130	102 (0.77)	95 (sp)
	9. III	„								
Nr. 3 17.5 kg	4. II	0.45	20		85 (-)	188 (0.46)	143 (0.46)	112	95 (sp)	95 (-)
	14. „	„	50		90 (-)	190 (1.05)	183 (1.05)	165	130 (1.00)	115 (0.47)
	9. „	„		2% Morphin- lösung 12 ccm	83 (-)	168 (0.47)	165 (0.47)	173 (1.95)	152 (1.95)	123 (0.95)
	17. „	„		„	85 (-)	205 (1.95)	200 (1.95)	157	127 (3.31)	118 (2.70)
	22. „	„		Chloroform- narkose	92 (-)	163 (1.07)	165 (1.07)	132	125 (0.87)	118 (sp)
		„		Äthernar- kose	95 (-)	170 (1.05)	151 (1.05)	132	108 (1.00)	108 (0.50)
	3. III	„								

TABELLE VI(2).

Hunde- Nr.	Da- tum 1930	Aco- tyl- cholin g	Zucker cc	Narkotica	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)					
					vor	$\frac{1}{2}$ st.	1	$1\frac{1}{2}$	2	3
Nr. 4 13. kg	7. II	0.35	20		91 (-)	142	138 (sp)	115	92 (-)	87 (-)
	13. „	„	40		90 (-)	210	203 (1.52)	165	127 (1.20)	100 (-)
	9. „	„		2% Morphin- lösung 9 ccm	87 (-)	158	192 (0.82)	200	170 (2.55)	132 (2.90)
	28. „	„		Chloroform- narkose	92 (-)	195	190 (2.27)	148	127 (2.30)	106 (0.80)
	5. III	„		Äthernar- kose	85 (-)	177	142	140	110	98 (0.58)
	8. „	„		„	85 (-)	150	136 (0.81)	100	95 (0.57)	97 2 $\frac{1}{2}$ st †
	7. II	0.45	30		95 (-)	210	200 (1.80)	152	120 (0.80)	92 (-)
	13. „	0.3	40		87 (-)	158	147 (0.40)	130	108 (sp)	110 (-)
Nr. 5 15.5 kg	9. „	0.45		2% Morphin- lösung 12 ccm	90 (-)	200	205 (1.18)	192	153 (3.00)	111 (2.05)
	28. „	0.3		Chloroform- narkose	85 (-)	149	140 (0.90)	127	130 (0.95)	108 (0.40)
	5. III	„		Äthernar- kose	90 (-)	150	157 (sp)	140	112 (0.40)	100 (0.58)
	9. „	„		„	92 (-)	162	159 (0.55)	120	101 (1.00)	97 (0.50)

ermitteln. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle VI wieder-
gegeben.

Aus der Tabelle kann man ersehen, dass der Schwellenwert bei
den narkotisierten Tieren immer niedriger als bei den Kontroll-
versuchen mit Zuckerzufuhr war, indem die Glykosurie bei einer
gleich starken Hyperglykämie dort unverkennbar grösser gefunden
wurde als hier. Bei diesen Versuchen war die schwellenernie-
drigende Wirkung des Morphins, Chloroforms und Äthers fast
gleich stark; und so war bei der annähernd gleich hohen Blutzucker-
steigerung die Glykosurie in den Versuchen mit den verschiedenen
Narkoticis ungefähr gleich gross. Dass Morphin bei meinen in den
vorangehenden Abschnitten mitgeteilten Versuchen weit stärker

schwellenerniedrigend wirkte als die übrigen Narkotica, beruht wohl darauf, dass der Sympathikus durch Morphin am stärksten gereizt wird, sodass die Hyperglykämie auch am deutlichsten in die Erscheinung trat.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Beim Hunde wirkt Morphin deutlich den Blutzucker steigernd und die Glykosurie hervorrufend. Das Gift hat daneben eine die Zuckerausscheidungsschwelle erniedrigende Wirkung, welche aber bei einer kleinen Morphinzufuhr nicht, und erst bei einer grossen Dosis deutlich zum Vorschein kommt. Die durch Adrenalin abnorm erhöhte Schwelle wird am auffallendsten durch Morphin herabgesetzt. Das Gift wirkt also auf den abnorm erhöhten Schwellenwert deutlich erniedrigend, aber nicht auf den normalen.

2. Die Chloroform- und Äthernarkose wirkt auch hyperglykämisierend und zugleich die Zuckerausscheidungsschwelle herabsetzend. Diese schwellenerniedrigende Wirkung der Gifte war bei adrenalinisierten Tieren deutlicher als sonst.

3. Der Blutzuckergehalt des Hundes wurde bei meinen Versuchen durch Alkoholfuhr nicht beeinflusst. Die schwellenerniedrigende Wirkung des Alkohols war auch schwächer als die der oben genannten Narkotica. Gegen einer normalen Schwellenwert wurde eine solche herabsetzende Wirkung vermisst, und nur bei Tieren, deren Schwelle durch Adrenalin übernormal erhöht war, nicht immer, aber oft mehr oder weniger deutlich beobachtet.

4. Durch Scopolamin war der Hund schwer zu narkotisieren, und oft wurde durch das Mittel ein Erregungszustand hervorgerufen. Bei den durch das Gift betäubten (ruhig gewordenen) Tieren wurde der durch Adrenalin- und Zuckerruhr erhöhte Blutzuckergehalt und der Schwellenwert nicht immer, aber oft in gewissem Masse heruntergedrückt. Bei aufgeregten Tieren wurde dagegen keine solche Wirkung, sondern eher eine Neigung zur gegenseitigen Erscheinung beobachtet.

5. Auf den durch Acetylcholin abnorm erhöhten Schwellen-

wert wirken Morphin, Chloroform und Äther deutlich herabsetzend, ebenso wie bei Kombinationsversuchen mit Adrenalin.

6. Je stärker die Schwelle durch die Steigerung der Sympathikotonie erhöht ist, desto deutlicher wird sie durch die Narkotica herabgesetzt. Dass Morphin bei meinen Versuchen die Herabsetzung der Schwelle häufig weit stärker als die übrigen Narkotica hervorrief, beruht wohl darauf, dass das Gift am stärksten sympathikotonisch wirkt.

Bei meinen Acetylcholinversuchen, wo eine fast gleich starke Hyperglykämie durch Morphin, Äther und Chloroform hervorgerufen wurde, wurde kein nachweisbarer Unterschied zwischen den schwellenerniedrigenden Wirkungen der Gifte konstatiert.

LITERATUR.

- Bertram, F. (1923): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., **37**, H. 1-3.
Blatterwick, N. and Maxwell, L. (1920): Americ. Jour. of Physio., **67**, No. 2.
Ellison, R. and Davis, L. (1920): Americ. Jour. of Physio., **45**, No. 3.
Eda, G. (1927): The Jour. of Biochem., **7**, No. 2.
Eujii, I. (1921): The Tohoku Jour. of exp. Med., **2**, No. 2-3
Gavrila, J. et Sparchez, T. (1928): Cpt. Rend. des Séanc. de la Soc. de Biol., **98**, No. I.
Hetenyi, G. (1924): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., **40**, H. 261.
Iwanaga, Y. (1930): The Jour. of Biochem., **12**, S. 195.
Kobayashi, K. (1927): Keio Igaku, **7**, Nr. 6
Kikuna, K. (1927): Osaka Igakkwai Zasshi, **23**, Nr. 12.
Kawashima, S. und Iwanaga, Y. (1929): The Jour. of Biochem, **11**, S. 293.
Kawashima, S. (1928): The Jour. of Biochem., **9**, S. 337.
Luzatto, L. (1904): Arch. f. exp. Pathol. und Pharma., **52**, Nr. 95.
Miyasaki, S. (1927): Kioto Furitsu Ikwadaigaku Zasshi, **1**, Nr. 4.
Masamune, H. (1926): Tokio Ijishinshi, Nr. 2481.
Marenzi, A. (1926): Cpt Rend. des Séanc. de la Soc. de Biol., **95**, Nr. 32.
Noma, S. und Fujii, I. (1927): Okayama Igakkwai Zasshi, Nr. 453.
Nakayama, M. (1924): The Jour. of Biochem., **4**, No. 1.
Nicolaus, F. und Förster, J. (1925): Biochem. Zeitschr, **159**, H. 1-2
Nitzescu, I. (1927): Cpt. Rend. des Séanc. de la Soc. de Biol., **97**, No. 27.
Oppermann, F. (1913): Deutsch. Zeitschr. f. Nervenheilkunde, **48**, S. 590.

- Steinmetzer, K. und Swoboda, F. (1928): Biochem. Zeitschr., **198**, H. 5.
Tokumitsu, B. und Katabuchi, H. (1922): Nippon Gekwagakkwai
Zasshi, **24**, Nr. 2.
Tsuchiya, S. (1927): Kioto Igakkwai Zasshi., **24**, Nr. 7.
Tate, H. und Hirayama, S. (1926): The Tohoku Jour. of exp. Med.,
8, Nr. 1.

THE FORMATION OF METHYLGLYOXAL FROM HEXOSEPHOSPHATE IN THE PRESENCE OF ANIMAL TISSUES.

By

HIROSHI INOUE.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical School, Niigata.
Director: Prof. N. Ariyama.)*

(Received for publication, February 2, 1931)

The trend of recent ideas in the study of the intermediary products of sugar metabolism is towards the view that methylglyoxal may be regarded with a fair degree of certainty as an intermediate between hexosephosphate and lactic acid. The biological evidence for the formation of methylglyoxal from the hexose has been, however, furnished only of late. Toenniessen and Fischer (1926) claim that they are able to demonstrate for the first time the production of methylglyoxal from hexose-di-phosphate in the presence of animal tissues. They use fresh muscle of the pig as the enzyme source and add pancreas tissue to it with the intention of retarding the action of glyoxalase, which converts methylglyoxal to lactic acid, by the action of "antiglyoxalase" contained in the pancreas. Ariyama (1928 i) recommends autolysed liver in preference to the mixture of muscle and pancreas for increasing the yield of methylglyoxal. Applying the autolysis-method, Vogt (1929) was able to show 30% conversion of hexose-di-phosphate to methylglyoxal. Neuberg and Kobel (1929 i & ii) succeeded in demonstrating the almost quantitative conversion of hexose-di-phosphate to methylglyoxal by the use of well washed lactic acid bacteria and yeast. Fromageot (1929) showed 90% yield of methylglyoxal from hexose-di-phosphate in the presence of alcohol-ether-dried colon bacteria. 70% conversion of sugar to methylglyoxal was pointed out by Widmann (1929 & 1930) at the time of glycolysis by the

acetone-dried and autolysed erythrocytes. Yamasaki (1930) obtained 77% yield by the use of dried *Torula colliculosa*. Autolysis, washing or drying of the enzyme source might be interpreted as depriving the material of the co-enzyme necessary for glyoxalase activity, thus allowing methylglyoxal to accumulate in the solution. The remarkably lower yield of methylglyoxal in the case of animal tissues compared with that in other cases prompted an inquiry into the possibility of establishing conditions under which the yield of methylglyoxal might be increased by the use of animal tissues.

I. THE METHOD FOR THE DETERMINATION OF METHYLGLYOXAL.

The quantitative determination of methylglyoxal was performed by Ariyama's colorimetric method (1928 ii). The reliability of the method was guaranteed on every occasion by examining the melting point of the p-nitrophenylosazone of the product which developed the typical blue colour with the reagents. The osazone had always the same melting point as the corresponding compound prepared from the pure methylglyoxal (283° uncorrected). The analyses of the osazones, which were performed now and then, constituted the only evidence of their purity. At the same time the product was found to be converted quantitatively into lactic acid by the action of glyoxalase. Thus, there is no reason for assuming that this product will be other than methylglyoxal. The detection of methylglyoxal as osazones is undoubtedly the most reliable method in the qualitative sense, but it seems to furnish no satisfactory basis for quantitative determination. For instance, the yield of raw p-nitrophenylosazone slightly exceeds, as a rule, the theoretical value, falling under 50% upon purifying them so as to raise the melting point to the expected temperature.

Magnesium hexose-di-phosphate, which was used as the substrate in my experiments, was prepared from calcium salt by the Neuberg and Sabetay method (1925).

II. THE ENZYME FOR THE PRODUCTION OF METHYLGLYOXAL FROM HEXOSEPHOSPHATE.

Ariyama (l. c. i) showed that the following two points were essential as the conditions for a better yield of methylglyoxal: the autolysis of the tissue should be carried out for 2 or 3 days at pH 7.0 and 37.5°, and the incubation of hexose-di-phosphate with the filtrate of the autolysed tissue should be continued for 3 days at pH 6.2 and 37.5°. Vogt (l. c.) claims that the residue of the autolysed tissues (liver, kidney and muscle of the pig and the rabbit) is distinctly more potent than the filtrate in its ability to form methylglyoxal from hexose-di-phosphate and that the filtrate has even a retarding effect on the action of the residue. Such a phenomenon was never noticed in my experiments. The filtrate was always more potent than the residue, as long as the tissue was subjected to autolysis for at least 48 hours. The discrepancy encountered can be traced, as Vogt also noticed, to the fact that a large amount of the co-enzyme survives in the filtrate of the tissue, which is autolysed for only 24 hours. In the presence of such a large quantity of the co-enzyme the filtrate of the autolysed tissue may indicate the dominance of lactic acid formation from methylglyoxal over the production of methylglyoxal from hexose-phosphate. After a lapse of 48 hours or longer, the content of the co-enzyme in the filtrate may become smaller and allow methylglyoxal to accumulate. The following experiment shows clearly that this is the case.

The finely minced fresh liver of a rabbit was autolysed at 37.5° with four parts of a boric acid-borax buffer solution of pH 7.0 and some toluene. After the lapse of 24, 48 and 72 hours, 10 cc. portion of the autolysate was taken out and centrifuged sharply. 0.2 gm. of magnesium hexose-di-phosphate was mixed with the supernatant fluid and the residue. The mixtures thus prepared were diluted to 100 cc. with 50 cc. of a buffer solution of pH 6.2 and water, and then incubated further with some toluene at 37.5°. As a control

10 cc. of the whole autolysate were treated in the same way. The amounts of methylglyoxal, lactic acid and inorganic phosphate in the incubated mixtures were examined every 24 hours. For this purpose 10 cc. were pipetted out of each mixture and deproteinized with 10 cc. of 4% trichloroacetic acid. Methylglyoxal in the filtrate was determined by the colorimetric method, lactic acid by the method of Friedemann, Cotonio and Shaffer, and free phosphate by the Briggs method. A slight amount of lactic acid formed spontaneously in the residue and in the whole autolysate was checked by another control and was deduced from the results shown in the main test. The data are summarized in Table I.

Several interesting conclusions may be seen from the data shown in the table. In the case of the filtrate, the yield of methylglyoxal increased as the autolysis was prolonged, with a concomitant decrease in the production of lactic acid. This is to be interpreted as the result of the weakening of the glyoxalase activity more rapidly than the enzyme responsible for the methylglyoxal formation ("glycolase" of Neuberg). On the other hand the liberation of inorganic phosphate decreased with the progress of autolysis, thus indicating the gradual destruction of the enzyme which decomposes the hexosephosphate molecule. The fact that the residue, contrary to the filtrate, lost its activity to produce methylglyoxal and lactic acid with the protraction of autolysis may be conceived as the sequence of the weakening of both glyoxalase and glycolase. In the case of the whole autolysate, the production of methylglyoxal and other substances was affected by autolysis in the same fashion as in the filtrate.

To sum up, the distribution of glyoxalase between the filtrate and the residue shifted in favour of the former when autolysis was continued for more than 48 hours. The duration of autolysis of the tissue is, it should be mentioned, one of the most significant factors involved in the present problem.

By means of various treatments, several attempts were made, in the mean-time, to save the time of autolysing the tissue for 48

TABLE I.
Production of Methylglyoxal by Filtrate and Residue of Autolysed Liver.

Time of autolysis (hr.)	Time of incubation of the autolysate with hexosephosphate (hr.)	Substances produced (mgm. in 100 cc.)								
		Filtrate			Residue			Whole autolysate		
		Methylglyoxal	Lactic acid	Inorganic phosphate	Methylglyoxal	Lactic acid	Inorganic phosphate	Methylglyoxal	Lactic acid	Inorganic phosphate
24	24	7.8	3.2	6.7	7.4	2.7	6.8	5.0	2.2	6.1
	48	8.1	4.3	11.3	7.5	3.2	11.7	6.0	3.2	11.0
	72	8.6	7.6	12.6	8.5	5.4	14.0	6.2	4.3	14.5
48	24	8.2	2.7	5.3	5.1	1.6	6.8	5.8	1.6	5.7
	48	10.1	3.8	10.8	6.8	2.7	9.8	6.2	3.2	10.5
	72	12.0	4.9	11.6	6.9	4.3	13.1	6.3	3.8	11.1
72	24	8.9	2.7	4.9	3.5	1.1	4.2	6.4	1.6	4.4
	48	10.6	3.8	8.5	5.5	2.2	9.5	6.5	2.2	9.1
	72	12.9	4.3	9.9	6.7	3.2	12.0	6.8	2.7	10.1

hours or longer to destroy glyoxalase. Sakuma's finding (1930) that glyoxalase is extremely sensitive towards alcohol led the present writer to attempt the separation of glycolase from glyoxalase by treating them with alcohol for a suitable period. It will be recalled that Vogt (l. c.) applied heat and alcohol for the same purpose with indifferent success. In my experiments, the alcohol-treatment of the liver hash has proved to serve a double purpose, that the liver powder thus prepared was almost as potent as the autolysed liver for the formation of methylglyoxal from hexose-phosphate, and that the powder kept its activity for at least three weeks.

The following experiment gives an idea of the production of methylglyoxal from hexose-di-phosphate by the liver powder prepared by the alcohol-treatment.

The finely minced fresh liver of a rabbit was treated with four parts of absolute alcohol for 10, 20, 30, 40 and 60 minutes respectively, filtered quickly through a Büchner funnel, washed with ether and then dried in an evacuated desiccator. 0.14–0.15 gm. of the powder corresponded to one gram of the fresh liver. The extraction of the enzyme out of the samples of the powder was carried out under the conditions which had been found to be the best by control experiments: namely the samples were extracted with 35 parts of a buffer solution of pH 6.2 at 25° for 24 hours and then filtered. Five cc. of the filtrates corresponded to one gram of the fresh tissue. The filtrates were used as the source of the enzyme. On the other hand a portion of the same fresh liver, from which the powder was prepared, was autolysed for 48 hours with 4 parts of a buffer solution of pH 7 at 37° with a view to compare its activity to produce methylglyoxal with that of the extracts of the powder. Five cc. of the filtrate of the autolysate corresponded to one gram of the fresh tissue. The extracts of the powder and the filtrate of the autolysate were mixed with hexose-di-phosphate in the following way and the increase of methylglyoxal in each mixture was examined every 24 hours.

Extracts of the samples of the powder or the filtrate of the autolysate.	5.0 cc.
Mg hexose-di-phosphate.	0.45 gm.
Buffer solution of pH 6.2.	50 cc.
Water.	To 100 cc.
Toluene.	2.0 cc.

A small amount of lactic acid, which was produced from the autolysate alone, was checked in a control experiment. The results are submitted in the following table.

TABEL II.
Alcohol-Treatment of Rabitt's Liver.

Time of incubation (hr.)	Time of alcohol-treatment										Autolysed liver (control)	
	10 min.		20 min.		30 min.		40 min.		60 min.			
	Methylglyoxal (MG) and lactic acid (LA) produced (mgm. in 100 cc.)											
	MG	LA	MG	LA	MG	LA	MG	LA	MG	LA	MG	LA
24	4.6	7.0	7.2	1.6	3.5	0.5	1.6	0.5	0	0	8.5	2.7
48	7.6	7.6	10.0	3.8	3.8	1.6	2.2	1.1	1.6	0	13.1	4.3
72	9.9	8.6	10.8	5.9	3.9	2.7	3.4	1.6	2.0	0	13.3	8.6

It is revealed in the above table that the liver powder, which had been treated with alcohol for 20 minutes, was only slightly inferior to the autolysed liver in its potency to produce methylglyoxal from hexose-di-phosphate. The powder may be thus used in place of the autolysed liver, though the result cannot yet be regarded as quite satisfactory.

Taken in conjunction with Sakuma's experiment (l.c.), in which he demonstrated the complete inactivation of glyoxalase by dialysing the tissue for 5 hours, the dialysis of the tissue might be full of instructive features in our present design to increase the

yield of methylglyoxal from hexosephosphate. Under this assumption the following experiment was carried out. The minced fresh liver of a rabbit was extracted with 4 parts of water for an hour at 25° and a part of the mixture was then filtered. 5 cc. of the filtrate were dialysed through a collodion sack against distilled water for 6 hours. On the other hand the original mixture was autolysed for 48 hours and filtered. The dialysed and autolysed samples were treated in the following manner.

Dialysed liver extract or filtrate of the autolysate.	Corresponding to 5 cc. of the original extract.
Mg hexose-di-phosphate.	0.45 gm.
Buffer solution of pH 6.2.	50 cc.
Water.	To 100 cc.
Toluene.	2.0 cc.

The mixtures were incubated at 37.5° and the quantities of methylglyoxal, lactic acid and free phosphate produced were determined at intervals of 24 hours. It was established in control experiments that the dialysed extract was completely indifferent towards methylglyoxal, even after 72 hours' contact with it, while the autolysate still contained a small amount of glyoxalase. In other controls, in which the dialysed extract and the filtrate of the autolysate were incubated without the addition of hexosephosphate, a small amount of lactic acid was found to be produced from the autolysate. The data are shown in Table III.

It should be emphasized that the most satisfactory results were achieved by using the dialysed liver extract: the yield of methylglyoxal was very high and the incubation was never troubled by the formation of lactic acid.

III. THE OPTIMUM CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF METHYLGLYOXAL FROM HEXOSE-DI-PHOSPHATE.

As cited in the preceding chapter, the optimum conditions for the formation of methylglyoxal from hexosephosphate, i. e. the

TABLE III.
Dialysis of Tissue.

Time of incubation with hexosephosphate (hr.)	Substances produced (mgm. in 100 cc.)									
	No. 1				No. 2					
	Dialysed extract		Autolysate		Dialysed extract			Autolysate		
	Methyl- glyoxal	Lactic acid	Methyl- glyoxal	Lactic acid	Methyl- glyoxal	Lactic acid	Inorganic phosphate	Methyl- glyoxal	Lactic acid	Inorganic phosphate
24	5.3	0	6.8	1.1	6.6	0	4.1	5.3	1.6	5.1
48	6.7	0	7.2	4.3	7.7	0	5.9	7.0	3.8	8.1
72	8.3	0	7.7	6.5	9.6	0	7.9	8.5	5.9	9.7

optimum hydrogen-ion concentration and the duration of the autolysis of the tissue and of the incubation of the autolysed tissue with hexosephosphate were already discussed by Ariyama. It became, however, evident in the course of my experiments that the quantities of the enzyme as well as of the substrate had a marked influence upon the yield of methylglyoxal. This observation initiated an examination of the closer correlation of their quantities. The results of a series of experiments, which were performed by combining the amounts of hexose-di-phosphate and the liver extract (autolyzed for 48 hours) in various proportions, are submitted in Table IV.

Mg hexose-di-phosphate.	Varying amounts
Liver extract.	" "
Buffer solution (pH 6.2).	50 cc.
Water.	To 100 cc.
Toluene.	2 cc.

TABLE IV.

Influence of Amounts of Enzyme and Substrate on Production of Methylglyoxal.

Substrate (gm.)	Enzyme (cc.)											
	1 cc.						3 cc.					
	Substances produced after 72 hours' incubation (in 100 cc.)											
	Methylglyoxal		Lactic acid		Inorganic phosphate		Methylglyoxal		Lactic acid		Inorganic phosphate	
	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%
0.090	6.1	18.1	3.2	7.6	6.9	47.6	4.9	14.6	3.8	9.1	5.5	37.9
0.270	14.1	14.0	5.9	4.7	13.2	30.4	13.5	13.4	5.9	4.7	14.2	32.6
0.450	17.0	10.1	7.0	3.3	12.1	16.7	11.5	6.8	10.8	5.1	13.8	19.0

Substrate (gm.)	Enzyme (cc.)											
	5 cc.						10 cc.					
	Substances produced after 72 hours' incubation (in 100 cc.)											
	Methylglyoxal		Lactic acid		Inorganic phosphate		Methylglyoxal		Lactic acid		Inorganic phosphate	
	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%	mgm.	%
0.090	3.6	10.7	4.4	10.5	6.4	44.1	3.4	10.1	6.5	15.5	6.9	47.6
0.270	10.8	10.6	6.5	5.2	16.1	37.0	9.3	9.2	8.1	6.4	16.8	38.6
0.450	8.7	5.2	11.9	5.2	15.6	21.9	5.5	3.2	13.0	6.2	16.5	22.8

The mixtures were analysed for their content of methylglyoxal, lactic acid and free phosphate after 3 days' incubation at 37°. In all of the above experiments appropriate blank tests were constantly carried out and small amounts of lactic acid, which were produced from the liver extracts alone, were deduced from

the results shown in the main test. The amounts of the reaction-products are expressed in present yields calculated under the assumption that two molecules of methylglyoxal or lactic acid, and two atoms of phosphorus are *directly* produced from a molecule of hexosephosphate.

The table brings out, among other things, the fact that the yield of methylglyoxal tends to rise with the use of smaller amounts of enzyme and substrate. Then, the application of the minimum quantity of enzyme and substrate should produce the maximum yield of methylglyoxal. Thus, another factor was introduced into the problem.

IV. THE MAXIMUM YIELD OF METHYLGLYOXAL PRODUCIBLE FROM HEXOSPAPHATE.

Turning now to more characteristics of the formation of methylglyoxal, the balance-sheet between the yield of methylglyoxal and the quantity of hexose-di-phosphate, which was actually consumed for the formation of methylglyoxal, was examined in detail. In accordance with Neuberg and Kobel's initiation (l.c.) the quantities of inorganic phosphate, hexose-mono-phosphate and free hexose served, besides methylglyoxal and lactic acid, as the basis of the calculation in my experiments.

One of the troubles encountered in the balance-sheet experiment is how to deal with glyoxalase which survives the autolysis and consumes methylglyoxal formed. Neuberg and his pupils used in their "Bilanz-Versuch" to check the action of the surviving glyoxalase by adding a known amount of methylglyoxal preparation to it and by supplementing the quantity of methylglyoxal which thus disappeared to the amount formed in the main test. Such a control experiment seems, however, to furnish no reliable basis for the estimation of the action of the surviving glyoxalase. On the one hand, glyoxalase consumes methylglyoxal at the very moment of its formation, whereas on the other hand glyoxalase is loaded all at once with relatively large amount of methylglyoxal

preparation. The difference in the circumstances, under which glyoxalase acts in the manner mentioned above, may possibly cause errors of magnitude which can not be ignored. It should also be taken into consideration whether the reactivity of methylglyoxal formed biologically from hexosephosphate and of the sample prepared synthetically would be the same or not. Indications were really obtained of the difference of the reactivity of these two samples of methylglyoxal in some experiments. Nevertheless, the same evidence, that lactic acid is formed directly from methylglyoxal, seems to open the way to overcome these obstacles. That is, there may be no valid objection to the assumption that the total amount of methylglyoxal, which is actually formed from hexosephosphate, should be the sum of the quantities of the free methylglyoxal and the methylglyoxal, which is computed indirectly from the amount of the lactic acid produced from methylglyoxal by glyoxalase. The possibility of the formation of lactic acid from other sources than methylglyoxal was excluded by the fact that only a trace of lactic acid was produced from the autolysed tissue, if hexosephosphate was not added to it. This assumption constituted the calculative basis of the present experiments.

In preliminary experiments it was found that the amount of methylglyoxal which was consumed by the surviving glyoxalase was always larger when calculated under the assumption mentioned above than when measured in the manner of Neuberg. The experiments which were set up for this purpose are as follows: the rabbit's liver which had been autolysed for 48 hours, was incubated with 1) magnesium hexose-di-phosphate and 2) methylglyoxal. The amount of methylglyoxal added was adjusted so as to be roughly proportional to that which was expected to be formed from hexosephosphate in the former experiment. The increase of lactic acid in the first case and the decrease of methylglyoxal in the second case were determined at intervals of 24 hours. A small amount of lactic acid which was produced from the autolysed liver alone was deduced from the results of the main experiments. The

lactic acid formed was converted to methylglyoxal and its quantity was compared with that of the methylglyoxal which was consumed by the surviving glyoxalase. The results are summarized in Table V.

1) Magnesium hexose-di-phosphate.	0.2 gm.
Autolysed liver.	2.0 cc.
Buffer solution (pH 6.2).	50 cc.
Water.	To 100 cc.
Toluene.	2.0 cc.
2) Methylglyoxal.	14.6 mgm.
Autolysed liver.	2.0 cc.
Buffer solution (pH 6.2).	50 cc.
Water.	To 100 cc.
Toluene.	2.0 cc.

The conditions for the balance-sheet experiments were suggested by a consideration of the details of the studies on the optimum conditions for the production of methylglyoxal, which might well be considered as the forerunners of the present experiments. The incubation was carried out with the smallest amounts of hexose-di-phosphate and enzyme (rabbit's liver extract autolyzed for 48 hours) possible without compromising the accuracy of the determination method.

Mg hexose-di-phosphate.	0.45 gm.
Enzyme.	5.0 cc.
Buffer solution (pH 6.2).	100 cc.
Water.	To 250 cc.
Toluene.	3 cc.

The mixture was analyzed after 48 hours' incubation at 37°. Methylglyoxal and lactic acid were determined in the trichloroacetic acid filtrate by the methods mentioned elsewhere. inorganic phosphate, hexose- mono- and -di-phosphate and free sugar were examined by the pioneering methods of Neuberg and Kobel ((l. c.). For this purpose the trichloroacetic acid-filtrate of 200 cc. of the mixture

TABLE V.

Quantity of Methylglyoxal Consumed by the Surviving Glyoxalase.

Time of incubation (hr.)	No. 1						
	The Author				Neuberg		
	Increase of methyl- glyoxal	Increase of lactic acid		Total methyl- glyoxal	Decrease of methyl- glyoxal	Increase of lactic acid	Total methyl- glyoxal
		Found	As methyl- glyoxal				
	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)
24	5.93	2.16	1.73	7.66	1.06	(1.35)	6.99
48	8.46	4.86	3.89	12.35	2.99	(3.78)	11.45

Time of incubation (hr.)	No. 2						
	The author				Neuberg		
	Increase of methyl- glyoxal	Increase of lactic acid		Total methyl- glyoxal	Decrease of methyl- glyoxal	Increase of lactic acid	Total methyl- glyoxal
		Found	As methyl- glyoxal				
	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)
24	5.93	2.16	1.73	7.66	0.89	(1.08)	6.82
48	8.64	4.86	3.89	12.33	2.70	(3.78)	11.34

was treated with 6-8 parts of absolute alcohol to precipitate inorganic phosphate, hexose-mono- and -di-phosphate completely. The alcohol-precipitate was dissolved in water and inorganic phosphate of the solution was determined by the Briggs method. The

separation of the mono-phosphate from the di-phosphate was carried out by filtering the hot solution of the barium salts of these phosphates. The filtration while hot was repeated several times to separate the salts as completely as possible. The di-phosphate remaining on the filter paper and the mono-phosphate present in the filtrate were determined colorimetrically after decomposing them with nitric acid and perhydrole. The amount of the free sugar was calculated from the difference of the reduction values before and after fermenting the alcohol-filtrate (the alcohol having been previously driven off) of the original mixture by the Somogyi method (1927). The reduction value was expressed in terms of glucose. It need hardly be added that comparative blank tests were constantly carried out with the omission either of the enzyme or the substrate and that every effort was made to guard against confusion in the calculations. A small amount of inorganic phosphate was found to accompany the hexose-di-phosphate preparation even after it had been put through a rigorous process of purification. The autolysed liver contained a little inorganic phosphate and lactic acid and the latter increased slightly during incubation. The results of a limited number of experiments are shown in Table VI. The calculation of the yield of methylglyoxal was made in the following way. The total free phosphate consists of the phosphate liberated at the time of the decomposition of hexose-di-phosphate to mono-phosphate, free sugar and methylglyoxal. The amount of the free phosphate, the liberation of which is necessitated by the formation of methylglyoxal, can be, then, deduced by subtracting the sum of the free phosphate, which corresponds to the formation of hexose-mono-phosphate and free sugar, from the total free phosphate. This amount of the free phosphate is converted into methylglyoxal under the assumption that two molecules of methylglyoxal should correspond to one molecule of hexose-di-phosphate, or, stated differently, one molecule of methylglyoxal must be counter-balanced with an atom of phosphorous. The yield of methylglyoxal is reckoned from the ratio between the amount of methylglyoxal thus

TABLE VI.

Balance-Sheet Experiments with Autolysed Liver.

A

	Number of experiments						
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7
Substances produced from hexose-di-phosphate (mgm. in 250 cc.)							
1) Free methylglyoxal.	15.53	19.18	24.98	30.00	38.73	18.58	24.50
2) Lactic acid	20.30	8.10	17.55	12.15	26.33	12.15	15.18
3) Total methylglyoxal	31.77	25.66	39.02	39.72	59.79	28.30	36.64
4) Hexose-mono-phosphate	3.35	4.50	5.00	5.65	7.35	17.78	5.60
5) Free sugar	14.50	23.00	22.00	23.00	17.50	15.00	12.00
6) Total inorganic phosphate	22.00	21.95	25.48	26.20	34.03	19.45	22.03

B

Substances, the formation of which necessitated the liberation of inorganic phosphate from hexose-di-phosphate.	Inorganic phosphate liberated (mgm. in 250 cc.)						
7) Hexose-mono-phosphate	0.37	0.50	0.55	0.61	0.81	1.30	0.62
8) Free sugar	5.00	7.91	7.57	7.91	6.02	5.16	4.13
9) Methylglyoxal* ₁	16.63	13.49	17.36	17.68	27.20	12.99	17.28

C

10) Methylglyoxal, corresponding to the amount of phosphate (9)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)	(mgm.)
	38.08	30.89	39.75	40.45	62.29	29.75	39.57
11) Yield of methylglyoxal* ₂	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	83.4	83.1	98.3	98.2	96.0	95.3	92.7

*₁ (9) = (6) · [(7) + (8)].

*₂ (11) = (3) ÷ (10) × (100).

TABLE VII.

Balance-Sheet Experiments with Dialysed Liver.

A

	Number of experiments	
	No. 1	No. 2
Substances produced from hexose-di-phosphate (mgm. in 250 cc.)		
1) Free methylglyoxal	11.55	16.00
2) Lactic acid	4.05	2.70
3) Total methylglyoxal	14.79	18.16
4) Hexose-mono-phosphate	9.20	6.00
5) Free sugar	10.00	12.75
6) Total inorganic phosphate	11.98	13.68

B

Substances, the formation of which necessitated the liberation of inorganic phosphate from hexose-di-phosphate	Inorganic phosphate liberated (mgm. in 250 cc.)	
7) Hexose-mono-phosphate	1.01	0.66
8) Free sugar	3.45	4.40
9) Methylglyoxal* ₁	7.52	8.62

C

10) Methylglyoxal, corresponding to the amount of phosphate (9)	(mgm.) 17.22	(mgm.) 19.74
11) Yield of methylglyoxal* ₂	(%) 85.9	(%) 92.0

*₁ (9) = (6) - [(7) + (8)].*₂ (11) = (3) ÷ (10) × 100.

calculated and the quantity of the total methylglyoxal which is actually determined in the experiment. The total amount of methylglyoxal found in the experiment is, as is stated above, the sum of the free methylglyoxal and the methylglyoxal which is computed from the lactic acid formed.

Stress should be laid upon the high yield of methylglyoxal in my experiments (83-98%). It may be asserted in some cases that 100% production of methylglyoxal was achieved. The present writer can not agree with Vogt's view so far as a definite amount of the free sugar was found among the reaction-products in my experiments.

Finally we will cite another case where the dialysed liver extract was applied as the source of the enzyme. For this purpose, 5 cc. of 20% watery extract of fresh rabbit's liver were dialysed for 6 hours. (For particulars Chapter II should be referred to.) The procedures of the experiments followed precisely the same lines described in the case of the autolysed liver.

We noticed again the high yield of methylglyoxal. The characteristic feature in this case was the extremely low yield of lactic acid, which was just the most desirable condition for the balance-sheet experiment.

Our results add materially to the evidence that methylglyoxal is actually formed from hexose-di-phosphate in the presence of animal tissues.

SUMMARY.

1. The enzyme which is responsible for the production of methylglyoxal from hexosephosphate can be easily separated from the obstinately accompanying glyoxalase by dialysing the animal tissues or treating them with alcohol. These methods are preferable to the familiar autolysis-method in that they save much time. Particularly the dialysis-method has proved to be the most desirable one, as it destroys glyoxalase activity completely within several hours.

2. The optimum conditions for the production of methylglyoxal from hexosephosphate are studied. The use of the smallest possible quantity of enzyme and substrate is one of the essential factors.

3. When the autolysed or dialysed animal tissues are incubated with hexose-di-phosphate under the optimum conditions, almost 100% conversion of hexosephosphate to methylglyoxal is achieved.

REFERENCES.

- Ariyama, N. (1928 i): J. Biol. Chem., **77**, 395.
 Ariyama, N. (1928 ii): J. Biol. Chem., **77**, 359.
 Fromageot, Cl. (1929): Biochem. Z., **216**, 467.
 Neuberg, C. and Kobel, M. (1929): Biochem. Z., **207**, 232.
 Neuberg, C. and Kobel, M. (1929): Biochem. Z., **210**, 466.
 Neuberg, C. and Sabetay, S. (1925): Biochem. Z., **161**, 240.
 Sakuma, F. (1930): J. Biochem., **12**, 247.
 Somogyi, M. (1927): J. Biol. Chem., **75**, 33.
 Toenniessen, E. and Fischer, W. (1926): Z. physiol. Chem., **161**, 254.
 Vogt, M. (1929): Biochem. Z., **211**, 17.
 Widmann, E. (1929): Biochem. Z., **216**, 479; (1930) **224**, 157.
 Yamasaki, I. (1930): Biochem. Z., **218**, 468.

KONSTITUTION DER POLYPEPTIDE UND PROTEOLYTISCHE FERMENTE.

VON

YASUTARO MIYANOKI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 6. Februar 1931)

Das Verhältnis der chemischen Struktur des Polypeptids zu seiner Angreifbarkeit durch proteolytische Fermente wurde seit Fischers bahnbrechender Arbeit von vielen Autoren studiert. Abderhalden, Euler und Waldschmidt-Leitz haben sich besonders eingehend mit dieser Frage beschäftigt, und manche neue Tatsachen wurden dadurch dargeboten. Was uns darunter am meisten interessiert, ist erstens, dass der spezifische Wirkungsbereich des Trypsins und Erepsins von den Arten der Aminosäure bedingt wird, die sich an dem Aufbau der hydrolysierbaren Polypeptide beteiligt. Zweitens, dass die Affinität des Ferments zum Substrat bei Trypsin durch die freie Carboxylgruppe des Polypeptids, dagegen bei Erepsin durch seine freie Aminogruppe vermittelt wird. Die für solche Experimente gebrauchten Substrate waren meistens Polypeptide oder ihre Derivate, die aus Monoaminomonocarbonsäuren zusammengesetzt sind. In hiesigem Institut hat man seit langem für das Verhalten der Monoaminodicarbonsäure enthaltenden Polypeptide Interesse gehabt. Nakashima(1927) hat angegeben, dass Glycylasparagin, Glycylasparaginsäure und Asparagylglycin ausschliesslich nur durch Erepsin hydrolysierbar sind, und dass die erste Verbindung durch ihre ausgezeichnet schnelle Hydrolysierbarkeit sich von den anderen unterscheidet, was mit der Bedeckung der einen Carboxylgruppe durch eine Aminogruppe zu tun hat.

Suzuki(1931) hat weiter Tripeptide, die Asparaginsäure enthalten, dargestellt, um ihr Verhalten zu Proteasen zu unter-

suchen. Es waren Glycylglycylasparagin, Glycylglycylasparaginsäure, Glycylasparagylglycin und Asparagylidiglycin. Seine Experimente ergaben, dass die aus Asparaginsäure und Glycin aufgebauten Dipeptide bei Kettenverlängerung durch Bindung mit einem anderem Molekül Glycin keine Veränderung hinsichtlich des fermentativen Verhaltens aufwiesen. Die untersuchten Tripeptide waren alle resistent gegen Proteasen, mit Ausnahme von Erepsin, und ausserdem wurde Glycylglycylasparagin durch dieses Ferment viel leichter als Glycylglycylasparaginsäure hydrolysiert, was auch bei den entsprechenden Dipeptiden der Fall war.

Suzuki beobachtete aber eine sehr merkwürdige Tatsache, als er Asparagylidityrosin darstellte und dieses neue Tripeptid der fermentativen Hydrolyse überliess. Dieses Tripeptid gehört, strukturell betrachtet, zu derselben Gruppe wie Asparagylidiglycin; trotzdem wird es nicht mehr durch Erepsin angegriffen, wohl aber in merkwürdiger Weise durch Trypsin-Kinase.

Seitdem die proteolytischen Fermente unter dem von Waldschmidt-Leitz aufgestellten Begriff studiert wurden, waren manche künstlich hergestellte Polypeptide bekannt, die durch Trypsin-Kinase gespalten wurden. Sie waren aber auch durch inaktiviertes Trypsin hydrolysierbar, obwohl ereptische Angreifbarkeit in einigen Fällen nicht zu beobachten war. Bei Asparagylidityrosin war es anders. Es wurde nur durch Trypsin, und zwar ausschliesslich durch aktiviertes Trypsin, Trypsin-Kinase, gespalten. Der Unterschied zwischen Trypsin und Trypsin-Kinase wurde eben bei der Wirkung auf die hochmolekularen Proteine bemerkt.

Bei der tryptischen Spaltung der einfacheren Substrate hat man wohl später einen begünstigenden Einfluss der Kinase beobachtet, aber es handelt sich hier nicht um die wesentliche Veränderung des Wirkungsbereichs von Trypsin, wie sie eigentlich bei der Proteolyse beobachtet wird. Wenn die Polypeptide überhaupt nach den Arten der sie aufbauenden Aminosäuren selektiv durch die Proteolytischen Fermente angreifbar sind, sollte man Versuche mit den Substraten anstellen, die die verschiedenen Arten Amino-

säuren in sich enthalten. Die hier mitzuteilenden Versuche sind unter dieser Idee bei einer Reihe der synthetisierten Peptide ausgeführt worden.

Zuerst wurden die Glycylderivate der Diaminopropionsäure, Diglycyl- und Monoglycyldiaminopropionsäure hergestellt. Diese Aminosäure findet sich nicht in Natur, aber sie stellt die einfachste Diaminosäure dar, die überhaupt künstlich zu bekommen ist. Unter den beiden erwähnten Glycylverbindungen mag die Monoglycyldiaminopropionsäure, strukturell betrachtet, in zwei Formen vorkommen, nämlich in α - oder β -Verbindung. Experimentell wurde festgestellt, dass dieses Dipeptid die β -Verbindung war; der Verfasser hat durch Desaminieren und nachherige reduktive Hydrolyse daraus β -Alanin bekommen, das mittels N-Gehalts und Schmelzpunkts als solches gesichert wurde. Mit diesem Dipeptid steht das Glycylisoserin in innigem Zusammenhang, das durch Aminieren des Chloracetylisoserins hergestellt wurde. Dieses Dipeptid kann als ein an der α -Aminogruppe des Diaminosäurenrests hydrolytisch desaminiertes Derivat der Monoglycyldiaminopropionsäure betrachtet werden. Das Experiment ergab, dass die geprüften Peptide, nämlich Glycylisoserin, Glycyldiaminopropionsäure und Diglycyldiaminopropionsäure, durch Erepsin hydrolytisch spaltbar waren, aber weit schwerer als Glycylasparagin. Glycylisoserin und Glycyldiaminopropionsäure waren resistent gegen andere Proteasen. Dagegen konnten Diglycyldiaminopropionsäure durch Trypsin, Trypsin-Kinase und Papain-HCN hydrolysiert werden. Man sieht also, dass der Monoglycyldiaminopropionsäure bei weiterem Verketteten mit einem Molekül Glycin, die ereptische Hydrolysierbarkeit beibehaltend, eine neue Eigenschaft als ein Substrat des Trypsin- und Papainferments gewährt wird.

Als zweiter Schritt wurde ein Dipeptid untersucht, das Asparaginsäure enthält. Es war Asparagylasparagin. Die aus Asparaginsäure und Glycin bestehenden Di- und Tripeptide wurden schon von Nakashima und Suzuki studiert. Asparagylasparagin konnte durch Erepsin leichter als die oben erwähnten

Diaminosäure enthaltenden Peptide hydrolysiert werden, und war ausserdem durch Papain-HCN spaltbar, aber resistent gegen das tryptische Ferment.

Die bisher behandelten Peptide enthalten Diaminosäure oder Dicarbonsäure. Die nächste Frage war, wie ein Peptid sich verhalten würde, wenn es Diaminosäure und Dicarbonsäure gleichzeitig in sich enthält. Es wurde daher Asparagylhistidin hergestellt. Sein Pikrolonat konnte als Kristalle bekommen werden.

Dieses Dipeptid zeigte sich aber hinsichtlich des fermentativen Verhaltens gleich mit Asparagylmonoglycin oder Monoglycyldiaminopropionsäure. Sie wurden alle nur durch Erepsin hydrolysiert. Wenn man dem Histidin, als eine das enzymatische Verhalten des aufgebauten Substrats bedingende Diaminosäure, bei seiner Teilnahme an der Peptidkette dieselbe Rolle wie der Diaminopropionsäure zuschreiben darf, so gilt Folgendes: Sowohl bei Überführung der Glycyldiaminosäure zu Asparagyl-diaminosäure, als die des Asparagylglycins zu Asparagyl-diaminosäure verursachen gar keine Veränderung in dem Verhalten zu Proteasen. Der Versuch mit Asparagylhistidin ergab also eine Regel über den Zusammenhang der Konstitution der Polypeptide mit ihrer enzymatischen Angreifbarkeit. Ausserdem interessiert uns dieses Dipeptid, indem es strukturell mit Carnosin verwandt ist.

Carnosin wurde zuerst von Gulewitsch und Amiradzibi (1900) in Fleischextrakt gefunden und als ein aus β -Alanin und Histidin bestehendes Dipeptid angegeben. Baumann und Ingvalden (1918) haben später β -Alanylhistidin künstlich aufgebaut, das mit dem Carnosin chemisch identisch war, und haben damit der Struktur des Carnosins festgestellt. Die physiologische Wirkung des Carnosins wurde besonders von russischen Autoren studiert. Krimberg und Komarow (1926, 1928) haben eine starke excitosekretorische Wirkung der Carnosin- und Carnosin-methylguanidin-Fraktion auf die Magendrüse beobachtet.

Nach diesen Autoren rief das reine Carnosin, intravenös injiziert, schon in 10–20 mg pro kg eine deutliche Steigerung der

Magensekretion hervor, und selbst 90 mg pro kg verursachten keine Nebenerscheinungen, die aber bei Einführung der Carnosin-methylguanidinfraktion oft angetroffen wurden. Korchow(1927) hat auch beobachtet, dass die Carnosinfraktion bei subkutaner, intravenöser und selbst oraler Zuführung die Sekretion der Magendrüse deutlich steigerte. Die anregende Wirkung des Fleischextrakts auf Gallen- und Pankreassaftsekretion wurde seit früher anerkannt. Krimberg und Momarow (1927) haben bei Fraktionieren des Fleischextrakts in Carnosinmethylguanidinfraktion eine starke excitosekretorische Wirkung auf diese Organe beobachtet, aber nicht bei reinem Carnosin oder der Carnosinfraktion.

Gegen die Angabe der Krimberg-Schule haben aber Rosenkow, Derwies und Sserwerin (1926) gesprochen, indem sie eine schwache magensafttreibende Wirkung des Carnosins beobachteten, das aber durch die Quecksilbermethode isoliert wurde. Nach diesen Autoren verdankt der Fleischextrakt seine excitosekretorische Wirkung nur in geringem Grad dem Carnosin. Jedenfalls ist die von Krimberg aufgestellte Theorie über die hormonale Beeinflussbarkeit der Verdauungssaftsekretion durch die Muskelbestandteile sehr bemerkenswert und erwartet eine weitere umfangreiche Erforschung.

In betreff der biologischen Bildung des Carnosins (β -Alanylhistidins) wurde von Gulewitsch(1911) und Kaplansky(1926) Decarboxylieren des Asparagylhistidins angenommen. Wenn dies der Fall ist, so sollte es interessant sein zu untersuchen, welche Wirkung überhaupt das synthetisch hergestellte Asparagylhistidin auf die Verdauungsdrüse ausübt, abgesehen davon, dass das Präparat als ein Gemisch der α - und β -Asparagylverbindungen betrachtet werden sollte.

Das Experiment wurde zuerst beim Hund mit dem Pawlow-schen Kleinmagen ausgeführt. Das Präparat war sehr wirksam. Selbst 0.01 g, d.h. 0.001 g pro kg, subkutan injiziert, zeigte eine deutliche excitosekretorische Wirkung. Toxische Erscheinungen fehlten, ausgenommen 2-3 tropfigen Speichelfluss, der nur 5

Minuten nach 1.0 g Injektion vorübergehend beobachtet wurde. Bei den Fällen, wo freie Salzsäure in der Vorperiode nicht vorhanden war, konnte sie in guter Menge in dem nach Injektion des Asparagylhistidins vermehrten Magensaft gemessen werden. Das injizierte Asparagylhistidin hat bei allen Fällen, dem vergrößerten Saftvolumen entsprechend, die absolut gesteigerte Sekretion der freien Salzsäure und des Pepsins mit sich gebracht. Das allgemeine Bild war sehr ähnlich dem bei der Gastrin- oder Sekretininjektion, die mit den in hiesigem Institut hergestellten Präparaten ausgeführt wurde.

Asparagylhistidin war, an Kaninchen geprüft, auch sehr wirksam auf die Pankreassekretion. Der aus der in den Ductus pancreaticus eingeführten Glaskanüle tröpfelnde Pankreassaft verminderte sich bei den Kontrolltieren in der Regel mit der Zeit. Die Injektion des Asparagylhistidins vergrößerte die Tropfenzahl weit über die der Vorperiode. Bekanntlich wirkt Sekretin exkretorisch auf die Pankreasdrüse. Die nach dem durch Sekretin hervorgerufene anfänglichen Steigen wieder gesunkene Pankreassekretion konnte durch Asparagylhistidin erneut wieder gesteigert werden.

Auf Gallenabsonderung untersucht, wirkte Asparagylhistidin bei Kaninchen und Katze auch stark safttreibend. Diese Wirkung konnte auch mit dem aus dem Pikrolonat wieder bekommenen Dipeptid erzielt werden.

Experimenteller Teil.

DARSTELLUNG DES MATERIALS

I. Darstellung der Glycyldiaminopropionsäure.

a. $\alpha\beta$ -Diaminopropionsäure.

Dibrompropylalkohol wurde nach Biilmann (1900) durch Brom-Anlagerung des Allylalkohols hergestellt und nach Winterstein und Küng (1909) mit Salpetersäure erhitzt, zu Dibrom--

propionsäure oxydiert. Diese Säure wurde dann nach Klebs (1893) in Druckflasche mit bei 0° gesättigtem Ammoniak erhitzt, und die gebildete Diaminopropionsäure nach der Entfernung des beigemengten Ammoniumbromides als ihr Monobromhydrat bekommen.

b. β -Monochloracetyl- $\alpha\beta$ -Diaminopropionsäure.

1.85 g Diaminopropionsäurebromhydrat (1 Mol.) wurde in 80 ccm 0.25N Barytlösung (2 Mol.) gelöst und unter guter Kühlung und starker Schüttelung abwechselnd mit 1.35 g Chloracetylchlorid (1.2 Mol.) in 60 ccm Aether und 60 ccm 0.25N wässrigem Baryt (1.5 Mol.) in Portionen und im Ablauf einer Stunde versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde noch eine Stunde in Kälte gestellt, und die von der ätherischen Schicht abgetrennte Lösung mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert und mit Silbersulfat behandelt. Der Überschuss von Silber und Schwefelsäure wurde durch Schwefelwasserstoff resp. Baryt entfernt. Die Lösung wurde dann unter vermindertem Druck eingeeengt und mit Alkohol bis zum Entstehen von Trübung versetzt und in Kälte aufbewahrt. Nach einigen Tagen schied sich darin die Monochloracetyldiaminopropionsäure als Kristalle aus. Zur Analyse wurde sie aus Wasser umkristallisiert und über Phosphorsäureanhydrid bei 100° im Vakuum getrocknet.

0.0310 g Substanz benötigten 3.44 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)

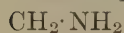
Für $\text{C}_5\text{ClH}_3\text{O}_3\text{N}_2$ (180.48) berechnet 15.51%N,

gefunden 15.53%N.

Die Monochloracetyldiaminopropionsäure kristallisiert in Blättchen, die sich manchmal in Drusen vereinigen. Sie schmilzt bei 180° und zersetzt sich bei 197° unter Schäumung und ist unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol oder Essigäther, schwer löslich in kaltem Wasser, aber leicht löslich in heissem Wasser. Die wässrige Lösung reagiert gegen Lakmus neutral.

Von der chemischen Struktur der Monochloracetyldiaminopropionsäure sind zwei Formeln denkbar:

α -Monochloracetyl-
Diaminopropionsäure



β -Monochloracetyl-
Diaminopropionsäure



Durch Desaminieren und dem folgende Reduktion mit gleichzeitiger Hydrolyse soll die α -Monochloracetyldiaminopropionsäure β -Alanin, die β -Monochlorverbindung ebenfalls β -Alanin liefern. Der Schmelzpunkt des α -Alanins ist 295° und der des β -Alanins 196° . Wenn also eine einheitliche Substanz durch das oben erwähnte chemische Verfahren zu bekommen und durch Analyse als Alanin festzustellen ist, kann die Differenzierung der Stellungsisomerie der erhaltenen Aminosäure durch die Bestimmung des Schmelzpunkts unschwer ausgeführt werden, und damit wäre die Struktur der dargestellten Monochloracetyldiaminopropionsäure zu entscheiden. Daher wurde der folgende Versuch angestellt.

0.2 g Monochloracetyldiaminopropionsäure, in 1.1 ccm N Salzsäure gelöst, wurden mit 0.2 g Silbernitrit versetzt und drei Stunden geschüttelt. Das entstandene Chlorsilber und überschüssige Silbernitrit wurden abfiltriert und mit einer kleinen Menge Wasser gewaschen. Das Filtrat und das Waschwasser wurden vereinigt, 30 Minuten auf 60° erwärmt, dann von dem überschüssigen Silber durch Schwefelwasserstoff befreit und im Vacuum bis zum Trocknen abgedampft. Der Rückstand wurde mit 1 ccm Jodwasserstoffsäure (Spez. Gewicht 1.96) und 0.4 g rotem Phosphor im geschlossenen Rohr fünf Stunden bei 120 – 125° erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde mittels einer kleinen Menge Wasser in Becher ausgegossen, auf dem Wasserbad abgedampft, mit Wasser aufgenommen und vom roten Phosphor abfiltriert. Das Filtrat wurde dann mit 1 g Bleioxyd auf dem Wasserbad erhitzt, um es von Jodwasserstoff zu befreien. Die vom Bleijodid abfiltrierte Lösung wurde weiter mit Schwefelwasserstoff entbleit, auf dem Wasserbad bis zum Trocknen abgedampft und mit Äther wiederholt gewaschen.

Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, mit Ammoniak gegen Lakmus neutralisiert und mit Alkohol bis zum dauernden Trüben versetzt. In den Eisschrank gestellt, schieden sich in einigen Tagen 0.038 g Kristalle aus. Die Kristallform war eine rhombische Tafel. Schmelzpunkt 199° . Die über Phosphorpentoxyd getrocknete Substanz ergab folgende Analyse:

0.03298 g Substanz benötigten 3.71 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)	
Für $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_1\text{O}_2$ (89.06)	berechnet 15.61%N,
	gefunden 15.75%N.

Kristallform, Schmelzpunkt und N-Gehalt zeigten, dass die erworbene Substanz β -Alanin war. Man kann also durch die oben hinsichtlich der Konstitutionsbestimmung erwähnten Gründe die untersuchte Monochloracetyldiaminopropionsäure als β -acylierte Verbindung annehmen.

c. Monoglycyldiaminopropionsäure.

1.5 g Monochloracetyldiaminopropionsäure wurden mit 10 ccm 25% Ammoniak bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 2 Tagen wurde sie unter vermindertem Druck bis zum Trocknen abgedampft, in Wasser aufgenommen und wieder bis zum Trocknen abgedampft. Der Rückstand wurde hierauf in wenig Wasser gelöst und durch Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde mit Methylalkohol gewaschen.

Da die Substanz noch Chlorammon einschloss, wurde sie in Wasser gelöst und wie üblich durch Silbersulfat dehalogeniert. Das Silber und die Schwefelsäure wurden dann quantitativ entfernt. Die konzentrierte Lösung wurde mit Alkohol gefällt.

Die Substanz war hygroskopisch und kristallisierte nicht. Die wässrige Lösung reagierte schwach alkalisch gegen Lakmus und zeigte Biuretreaktion. Über Phosphorpentoxyd getrocknet, ergab sie folgende Analyse:

0.0362 g Substanz benötigten 6.00 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)	
Für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_3 + \text{H}_2\text{O}$ (179.05)	berechnet 23.46%N,
	gefunden 23.39%N.

0.0145 g Substanz gaben 3.85 ccm van Slyke-N bei 16° C, 756 mm
 Für $C_5H_{11}O_3N_3 + H_2O$ (179.05) berechnet 15.65% NH_2-N ,
 gefunden 15.32% NH_2-N .

Die Substanz scheint also 1 Molekül Wasser hartnäckig beizubehalten. Da die freie Glycyldiaminopropionsäure nicht kristallisiert, wurde sie in Pikrolonat übergeführt. 0.15 g Dipeptid wurden in 10 ccm Wasser gelöst, mit 0.25 g Pikrolonsäure in Alkohol versetzt und bei niedriger Temperatur getrocknet. Der Rückstand wurde aus reichlichem heissem Wasser umkristallisiert. Die erhaltenen Kristalle wogen 0.3 g, und hatten nadelige Kristallform. Schmelzpunkt 213°, unter Zersetzung.

Über Phosphorpentoxyd getrocknet, ergab das Pikrolonat folgende Analyse:

0.0492 g Substanz benötigten 5.90 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)
 Für $C_5H_{11}O_3N_3 + C_{10}H_8O_5N_4$ (425.21) berechnet 16.46% N,
 gefunden 16.80% N.

II. Darstellung der Diglycyldiaminopropionsäure.

a. Dichloracetyldiaminopropionsäure.

Diese Säure wurde durch die Einwirkung von zwei Mol. Chloracetylchlorid auf 1 Mol. Diaminopropionsäure hergestellt. Da diese Säure in heissem Essigäther löslich und damit aus dem Reaktionsgemisch extrahierbar ist, wurde bei Aeylieren Natronlauge zur Alkalisierung des Mediums gebraucht.

1.85 g Diaminopropionsäure Bromhydrat (1 Mol.) wurden in 20 ccm N-Natronlauge gelöst, und unter starker Kühlung mit dem Kältegemisch wurden dazu 2.71 g Chloracetylchlorid (2.4 Mol.) in 20 ccm Äther und 28 ccm N-NaOH (2.8 Mol.) abwechselnd in Portionen wie üblich hinzugefügt; das Reaktionsgemisch wurde noch eine Stunde in der Kälte stehen gelassen. Es wurde dann mit 14 ccm N-HCl angesäuert, unter vermindertem Druck bei 50° bis zum Trocknen abgedampft und mit 50 ccm Essigäther ausgekocht. Der filtrierte Essigäther wurde dann eingedampft und mit Petrol-

äther versetzt. Der Niederschlag wurde in einer kleinen Menge von heissem Essigäther gelöst und abgekühlt. Reichliche nadelige Kristalle schieden sich daraus aus. Die Analyse der über Phosphorpentoxyd getrockneten Substanz zeigte, dass diese Dichloracetyldiaminopropionsäure war.

0.03856 g Substanz benötigten 2.95 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)

0.05814 g Substanz benötigten 4.40 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)

Für $\text{C}_7\text{Cl}_2\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ (256.96) berechnet 10.85%N,

gefunden 10.72%N und 10.60%N.

Sie löste sich leicht in Wasser, Alkohol, Aceton und heissem Essigäther, aber schwer in Äther oder Petroläther. Schmelzpunkt 127° .

b. Diglycyldiaminopropionsäure.

2 g Dichloracetyldiaminopropionsäure wurden in 20 ccm 25% Ammoniak gelöst und drei Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Lösung wurde dann unter vermindertem Druck abgedampft, und der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Salzsäure angesäuert. Das Halogen wurde mit Silbersulfat abgeschieden, und dann der Überschuss von Silber und Schwefelsäure wie üblich quantitativ entfernt. Die erhaltene Lösung wurde konzentriert und mit Alkohol versetzt. Der Niederschlag wurde wieder in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Die Substanz war hygroskopisch und konnte nicht als Kristalle bekommen werden. Die wässrige Lösung reagierte schwach alkalisch gegen Lakmus und zeigte deutliche Biuretreaktion. Die über Phosphorpentoxyd getrocknete Substanz gab die folgende Analyse, die zeigte, dass die Substanz Diglycyldiaminopropionsäure war:

0.0421 g Substanz benötigten 7.60 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)

0.01684 g Substanz gaben 3.90 ccm $\text{NH}_3\text{-N}$ (20°C , 762 mm)

Für $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ (218.164 g) berechnet 25.62%N,

gefunden 25.24%N.

berechnet 12.83% $\text{NH}_2\text{-N}$,

gefunden 13.21% $\text{NH}_2\text{-N}$.

III. Darstellung des Glycylisoserins.

a. Isoserin.

Isoserin wurde durch Aminierung der β -Chlormilchsäure hergestellt. Nach der Angabe von Fischer und Leuchs (1902) wurde Epichlorhydrin mit Salpetersäure zu β -Chlormilchsäure oxydiert. Die erhaltene Säure kristallisierte in Prismen und schmolz bei 78° . 14 g Chlormilchsäure wurden mit 140 ccm 23% Ammoniak in der Druckflasche 4 Stunden bei 120° erhitzt. Nach Abkühlung wurde der Inhalt mit überschüssigem Bleioxyd erwärmt und filtriert. Das eingedampfte Filtrat reagierte sauer. Es wurde mit Alkohol versetzt, mit Ammoniak neutralisiert und stehen gelassen. Isoserin kristallisierte daraus in rhombischer Tafel. Es bräunte sich bei 240° und zersetzte sich bei 243° .

0.1 g Substanz benötigten 9.30 ccm N/10 NaOH (Kjeldahl)

Für $C_3H_7NO_3$ (105.06)

berechnet 13.32%N,

gefunden 13.03%N.

b. Chloracetylisoserin.

1 g Isoserin wurde in 10 ccm N NaOH gelöst und unter Kühlung und Schüttelung mit 1.36 g Chloracetylchlorid in 20 ccm Äther und 15 ccm N-NaOH in Portionen versetzt. Die Chloracetylierung erforderte 30 Minuten. Das Reaktionsgemisch wurde noch eine Stunde stehen gelassen, und nach der Abtrennung der ätherischen Schicht die Lösung mit 13 ccm N-HCl angesäuert und unter vermindertem Druck getrocknet. Die Extraktion mit heissem Essigäther wurde wiederholt, und die vereinigten Extrakte wurde wieder abgedampft. Der Rückstand erstarrte bei Abkühlen zur kristallinen Masse. Diese wurde einmal mit Petroläther gewaschen, in 15 facher Menge heissen Essigäthers gelöst, eingengt und mit Petroläther bis zur Trübung versetzt. Das Chloracetylisoserin kristallisierte in Nadeln. Schmelzpunkt 92° . Die über Phosphor-pentoxyd getrocknete Substanz ergab die folgende Analyse:

0.0716 g Substanz benötigten 3.80 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)
 Für $\text{C}_6\text{Cl}_1\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_1$ (181.54) berechnet 7.72%N,
 gefunden 7.42%N.

Sie löst sich leicht in Wasser und Alkohol, ziemlich gut in Aceton und heissem Essigäther, aber schwer in Chloroform, Äther und Petroläther.

c. Glycylisoserin.

1 g Chloracetylisoserin wurde in 7 ccm 25% Ammoniak gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die von der geringen ungelösten Masse abfiltrierte Lösung wurde unter vermindertem Druck getrocknet, in Wasser gelöst und wieder getrocknet. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und mit Methylalkohol gefällt. Der Niederschlag wurde wieder in Wasser gelöst und mit Methylalkohol bis zur Trübung versetzt. Beim Aufbewahren in der Eiskammer kristallisierte Glycylisoserin in rhombischer Tafel. Es bräunnte sich bei 200° und zersetzte sich bei 215° . Die wässrige Lösung reagierte schwach sauer gegen Lakmus und zeigte schwache Biuretreaktion. Gesamt-N und $\text{NH}_2\text{-N}$ zeigten folgende Werte:

0.05 g Substanz benötigten 6.10 ccm N/10 NaOH (Kjeldahl)
 0.01 g Substanz gaben 1.58 ccm Van Slyke-N (21.5°C , 759 mm)
 Für $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4\text{N}_2$ (162.1) berechnet 17.29%N und 8.65% $\text{NH}_2\text{-N}$,
 gefunden 17.09%N und 8.92% $\text{NH}_2\text{-N}$.

IV. Darstellung des *Asparagylasparagins*.

Fumaryl-diasparaginsäurediäthylester wurde nach Fischer und Koenigs (1904) hergestellt und mit 7facher Menge 25% Ammoniak im geschlossenen Rohr 4 Stunden auf 100° erhitzt. Der Inhalt wurde dann unter verminderten Druck bis zum Trocknen abgedampft, um das freie Ammoniak zu entfernen. Dem in Wasser gelösten Rückstand wurde Baryt hinzugesetzt und zwar in etwas überschüssigerer Menge als in der für Sättigung der Carboxyl-

gruppen der Asparaginsäurereste berechneten. Durch Eindampfen im Vacuum wurde das Ammoniak möglichst entfernt, und dann das Barium mit Schwefelsäure quantitativ gefällt. Einengen der so erhaltenen Lösung und Fällern mit Alkohol wurden 2 Mal wiederholt, und eine kristallinische Masse wurde erhalten. Sie war sehr hygroskopisch. Die über Phosphorpentoxyd getrocknete Substanz zeigte einen Schmelzpunkt von 212° und die nachstehenden Analysenzahlen.

Die Bestimmung des in Säureamidform vorhandenen Ammoniaks wurde wie üblich durch Destillieren unter vermindertem Druck nach Alkalisieren mit Kalk ausgeführt.

0.03635 g Substanz benötigten 4.398 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)

0.00727 g Substanz gaben 0.725 ccm $\text{NH}_2\text{-N}$ (22°C , 759 mm)

0.0727 g Substanz lieferten 3.00 ccm N/10 Amid- NH_3

Für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6$ (247.14) berechnet 17.0% N, gefunden 16.95% N.

berechnet 5.66% $\text{NH}_2\text{-N}$, gefunden 5.61% $\text{NH}_2\text{-N}$.

berechnet 5.66% Amid-N, gefunden 5.79% Amid-N.

Die Analyse zeigte, dass die erhaltene Substanz eine Ammoniakverbindung der Asparagylasparaginsäure war und ein Molekül Ammoniak höchst wahrscheinlich gebunden in Form des Säureamids enthielt; ferner, dass ein Molekül Asparaginsäure des Ausgangsmaterials während des präparativen Verfahrens abgespalten wurde.

V. Darstellung des Asparagylhistidins.

Histidin wurde nach der Angabe von Hanke und Koessler (1920) aus Rindererythrocyten als Dichlorid hergestellt. Fünf Liter defibrinierten Blutes lieferten 25 g Histidindichlorhydrat. Der Schmelzpunkt war 245°C . 2.284 g Histidindichlorhydrat wurden in 160 ccm 0.25N-Baryt gelöst, und unter Kühlung und Schüttelung wurden in Portionen 1.81 g Fumarylchlorid in 80 ccm Äther und 160 ccm 0.25 N-Baryt hinzugefügt. Nach der Abtrennung der ätherischen Schicht wurde die wässrige Lösung mit N-HCl neutralisiert. Das Halogen wurde nach dem Silbersulfat-

verfahren entfernt. Der Überschuss des Silbers wurde mit Schwefelwasserstoff und der der Schwefelsäure mit Baryt entfernt. Das letzte Filtrat wurde unter vermindertem Druck und bei 40° eingengt und mit einigem Volums Alkohol gefällt. Das Kupelungsprodukt wurde durch 3 stündiges Erhitzen bei 100° im geschlossenen Rohr mit der 7 fachen Menge 20% Ammoniak aminiert. Der Inhalt wurde unter vermindertem Druck und bei 40° eingengt und nach dem Zusatz von 40 ccm 0.25 N-Baryt nochmals unter denselben Bedingungen eingengt, um ihr von freiem Ammoniak möglichst zu befreien. Die bis zu etwa 5 ccm konzentrierte Lösung wurde mit Wasser verdünnt, von Barium quantitativ durch Schwefelsäure befreit, unter vermindertem Druck eingengt und mit dem fünffachen Volumen absoluten Alkohols versetzt. Die gefällte Masse wurde in wenig Wasser aufgelöst und wieder mit Alkohol niedergeschlagen. Die Umfällung mit Alkohol wurde noch 2 Mal wiederholt, der letzte Niederschlag mit Alkohol und Äther getrocknet und im Vacuumexsikator aufbewahrt. Bei den wiederholten Darstellungen konnte die Substanz einmal in prismatischen Kristallen hergestellt werden, aber da sie sehr stark hygroskopisch war, konnte sie in dem gut kristallisierten Zustand nicht zur Analyse gebraucht werden.

Die über Phosphorpentoxyd bei 100° getrocknete Substanz, im Kapillarrohr erhitzt, schäumte bei 204° und zersetzte sich bei 206°. Die Analyse zeigte, dass Asparagylhistidin vorliegt.

0.0367 g Substanz benötigten 5.30 ccm N/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)

0.0170 g Substanz gaben 1.50 ccm $\text{NH}_2\text{-N}$ (19°C, 764 mm)

Für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6$ (270.06) berechnet 20.74% N u. 5.18% $\text{NH}_2\text{-N}$,
gefunden 20.20% N u. 5.06% $\text{NH}_2\text{-N}$.

Da das Asparagylhistidin kristallinisch nicht zu erhalten war, wurde es in Pikrolonat übergeführt. 0.4 g des Dipeptids wurde in 20 ccm Wasser gelöst und zusammen mit einer alkoholischen Lösung von 0.4 g Pikrolonsäure im Vacuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 50 ccm heissem Wasser aufgenommen und filtriert. Beim

Stehenlassen kristallisierte das Pikrolonat in gelblichen feinen Prismen.

Ausbeute 0.55 g. In Kapillaren erhitzt, schwärzte sich die getrocknete Substanz bei 206° unter Zersetzung.

Analyse: 0.0316 g Substanz benötigten 3.59 ccm N/10 H₂SO₄
(Kjeldahl)

0.0494 g Substanz gaben nach Duma verbrannt
8.70 ccm N₂ (16°C, 765 mm)

Für C₁₀H₁₆N₄O₆·C₁₀H₈N₄O₅ (534.06 g)
berechnet 15.73% Kjeldahl-N und 20.93%N,
gefunden 15.89% Kjeldahl-N und 20.67%N.

II. FERMENTVERSUCHE.

Der zeitliche Verlauf der fermentativen Hydrolyse wurde durch die Ermittlung der Zunahme des freien Amino-N nach van Slyke verfolgt.

Die berechnete Zunahme des Amino-N bei der Spaltung einer Peptidkette wurde als 100% angenommen, und aus der gefundenen Amino-N Zunahme wurde der prozentuelle Hydrolysegrad ausgerechnet. Alle Versuche bei 37°. Ph elektrometrisch.

1. Einwirkung des Erepsins.

Erepsinlösung wurde nach Rice (1915) aus Schweinsdarm hergestellt und dialysiert. Auf Glycylassparagin geprüft, zeigte sie bei Ph 7.98 folgende Hydrolyse:

Glycylassparagin	0.2 g	} mit Wasser zu 15 ccm aufgefüllt.
N-NaOH	0.5 ccm	
M/10 Phosphatpuffer	4.0 ccm	
Erepsinlösung	5.0 ccm	

Zeit	0 St.	2 St.	10 St.	48 St.	72 St.	96 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.225	0.897	1.065	1.086	1.134
Hydrolysegrad in %	0.0	16.7	66.3	78.7	80.5	84.0

a. Glycyldiaminopropionsäure.

0.85% Substratlösung 6 ccm }
 M/10 Phosphatpuffer 3 ccm } Ph 7.55
 Erepsinlösung 3 ccm }

Zeit	0 St.	4 St.	24 St.	48 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.017	0.028	0.096	0.109
Hydrolysegrad in %	0.0	2.6	4.7	14.8	15.8

b. Diglycyldiaminopropionsäure.

1.2% Substratlösung 6 ccm }
 M/10 Phosphatpuffer 3 ccm } Ph 8.02.
 Erepsinlösung 3 ccm }

Zeit	0 St.	4 St.	24 St.	48 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.056	0.278	0.390	0.485
Hydrolysegrad in %	0.0	3.3	16.4	23.0	28.6

c. Glycylisoserin.

1% Substratlösung 6 ccm }
 M/10 Phosphatpuffer 3 ccm } Ph 7.82.
 Erepsinlösung 3 ccm }

Zeit	0 St.	4 St.	24 St.	48 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.010	0.053	0.136	0.212
Hydrolysegrad in %	0.0	1.0	5.4	12.9	21.7

d. Asparagylasparagin.

1.5% Substratlösung 10 ccm }
 N-NaOH 0.5 ccm } Ph 7.47.
 M/10 Phosphatpuffer 4.5 ccm }
 Erepsinlösung 5 ccm }

Zeit	0 St.	4 St.	24 St.	48 St.	96 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.036	0.163	0.163	0.23	0.24
Hydrolysegrad in %	0.0	4.3	19.4	19.4	27.4	28.6

e. Asparagylhistidin.

2.47% Substratlösung	10.0 ccm	} Ph 7.72.
2 N-NaOH	0.8 ccm	
M/10 Phosphatpuffer	4.2 ccm	
Erepsinlösung	5.0 ccm	

Zeit	0 St.	4 St.	24 St.	48 St.	72 St.	96 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.012	0.028	0.070	0.122	0.168
Hydrolysegrad in %	0.0	0.9	2.2	5.4	9.4	12.9

2. Einwirkung des Trypsins und der Trypsinkinase.

Trypsin (Kahlbaum) wurde in 2% wässriger Lösung gebraucht. Diese Fermentlösung war unwirksam gegen Glycyl-asparagin und konnte als erepsinfrei angenommen werden. Hinsichtlich der tryptischen Wirkung war sie nur sehr schwach aktiviert. Darum wurde die Enterokinasenlösung nach Waldschmidt-Leitz (1927) aus dem getrockneten Schweinsdarpulver hergestellt, und vor der Anstellung des Fermentversuchs wurden 5 ccm davon, mit 0.2 g Trypsin auf 20 ccm verdünnt, 30 Minuten bei 37° stehen gelassen, um die Aktivierung des Trypsins zu vervollständigen.

Unter den geprüften Substraten konnte nur Diglycyldiaminopropionsäure durch Trypsin und Trypsin-Kinase angegriffen werden. Alle übrigen blieben intakt, selbst nach 120 Stunden. Um Raum zu sparen, werden nur die Ergebnisse mit Diglycyldiaminopropionsäure unten angegeben.

- a) 1.2% Diglycyldiaminopropionsäure 6 ccm }
 M/10 Phosphatpuffer 3 ccm } Ph 8.35.
 Trypsinlösung 3 ccm }

Zeit	0 St.	24 St.	48 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.000	0.064	0.130
Hydrolysegrad in %	0.0	0.0	4.1	8.4

- b) 1.2% Diglycyldiaminopropionsäure 6 ccm }
 M/10 Phosphatpuffer 3 ccm } Ph 8.21.
 Trypsin-Kinasenlösung 3 ccm }

Zeit	0 St.	24 St.	48 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.049	0.094	0.180
Hydrolysegrad in %	0.0	3.1	5.8	11.4

3. Einwirkung des Papains und des Papain-HCN.

Papain (Merek) wurde in 2% wässriger Lösung 2 Tage dialysiert und zum Versuch gebraucht. Zur Aktivierung wurden 50 ccm Dialysat mit 10 ccm M/10 Citrat und 10 ccm 3% mit HCl gegen Lakmus neutralisiertem Kaliumcyanid vereinigt und 3 Stunden bei 37° hingestellt. Alle untersuchten Substrate waren durch Papain nicht hydrolysierbar. Das aktivierte Papain verdaute aber Diglycyldiaminopropionsäure und Asparagylasparagin, jedoch die anderen Substrate blieben intakt.

- a) 1.2% Diglycyldiaminopropionsäure 6 ccm }
 N-HCl 0.25 ccm } Ph 4.8.
 M/10 Citrat 2.75 ccm }
 Papain-HCN 3.0 ccm }

Zeit	0 St.	24 St.	48 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.097	0.143	0.178
Hydrolysengrad in %	0.0	6.3	9.5	11.6

b) 1.5% Asparagylasparagin	10.0 ccm	} Ph 4.8.
N-NaOH	0.3 ccm	
M/10 Citrat	4.7 ccm	
Papain-HCN	5.0 ccm	

Zeit	0 St.	24 St.	120 St.
NH ₂ -N Zunahme in mg	0.000	0.072	0.116
Hydrolysengrad in %	0.0	8.2	13.1

4. *Einwirkung des Pepsins.*

Pepsin (Grübler) in 2%iger Lösung. Alle Substrate wurden nicht gespalten.

III. ÜBER DEN EINFLUSS DES ASPARAGYLHISTIDINS AUF DIE SEKRETION DER VERDAUUNGSDRÜSEN.

A. Magensekretion.

Als Versuchstiere stellte ich 2 Hunde mit Pawlowschem Kleinmagen bereit. Die Tiere wogen 10.5 kg (Nr. 1) und 12.7 kg (Nr. 2). Die Operation wurde nach der Vorschrift von Bickel und Katsch ausgeführt, und der kleine Magen wurde mittels metallischer Kanüle nach aussen kommunizierend hergerichtet. Die Wunde heilte gut, und die Tiere befanden sich wohl. 20 Tage nach der Operation wurde der erste Versuch unternommen. Das injizierte Material war in wenig Wasser gelöst und gegen Lakmus neutralisiert. Injektion subkutan. Bei den Versuchen lagen die Tiere ruhig in Seitenlage, und der aus dem mit der metallischen

Kanüle verbundenen Gummirohr tropfende Magensaft wurde jede Stunde gesammelt und gemessen. Die Versuchsdauer betrug jedesmal insgesamt 4 Stunden, eine Stunde vor der Injektion des Untersuchungsmaterials und 3 Stunden nach der Injektion.

Alle Versuche wurden frühmorgens in Nüchternheit der Tiere ausgeführt. An dem in jeder Stunde gesammelten Magensaft wurden freie Salzsäure, Gesamtacidität und Pepsingehalt bestimmt. 1 ccm Magensaft wurde mit Wasser 10 fach verdünnt und mit N/10 NaOH in der üblichen Weise titriert, zuerst gegen Dimethylaminoazobenzol, dann gegen Phenolphthalein als Indikator. Die gebrauchten Alkalivolumina wurden mit 100 multipliziert und als freie Salzsäure resp. Gesamtacidität ausgedrückt. Die Pepsin-Bestimmung erfolgte nach Fuld-Levison (1907).

1) *Kontrollversuch (Hund Nr. 1).*

Zeit	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge ccm	2.0	1.5	2.0	2.0
freie HCl	80	80	80	80
Gesamtacidität	90	—	90	90
Pepsin	64	—	64	64

2) *Kontrollversuch (Hund Nr. 2).*

Zeit	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge ccm	2.0	2.2	3.0	2.3
freie HCl	90	90	90	90
Gesamtacidität	100	100	100	100
Pepsin	125	125	125	125

3) Versuch mit Histidin (Hund Nr. 2).

0.1 g Histidindichlorid neutralisiert und subkutan injiziert.

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge ccm	2.2		2.0	1.5	3.0	1.5
freie HCl	80		40	60	60	60
Gesamtacidität	90		60	75	70	75
Pepsin	125		125	125	125	64

4) Versuch mit Asparagylasparagin (Hund Nr. 1).

0.5 g Dipeptid neutralisiert und subkutan injiziert.

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.
Menge ccm	1.4		3.5	1.5	1.5
freie HCl	80		80	80	80
Gesamtacidität	90		90	90	90
Pepsin	64		64	64	64

5) Versuch mit Asparagin (Hund Nr. 2).

0.1 g Asparagin neutralisiert und subkutan injiziert.

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge ccm	1.5		1.7	1.5	1.3	1.5
freie HCl	20		20	20	20	20
Gesamtacidität	85		80	80	70	75
Pepsin	250		250	250	250	250

6) Versuch mit Asparagylhistidin.

Verschiedene Mengen des Dipeptids neutralisiert und subkutan injiziert. Die Resultate sind tabellarisch unten angegeben.

a) 1.0 g

(Hund Nr. 1)

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.
Menge ccm	2		17.0	4.0	1.5
freie HCl	0		10	15	0
Gesamtacidität	25		25	25	15
Pepsin	32		16	16	16

b) 0.2 g

(Hund Nr. 2)

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.
Menge ccm	2.5		6.6	7.7	2.3
freie HCl	100		105	100	100
Gesamtacidität	110		110	110	110
Pepsin	125		125	125	125

c) 0.1 g

(Hund Nr. 1)

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge ccm	1.5		6.0	20.0	10.0	4.0
freie HCl	0		10	5	0	0
Gesamtacidität	20		20	10.0	5	5
Pepsin	32		4	4	0	0

d) 0.1 g

(Hund Nr. 1)

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge cem	1.5		5.0	6.0	3.0	1.0
freie HCl	0		40	40	40	40
Gesamtacidität	40		50	60	50	55
Pepsin	125		125	125	125	125

e) 0.1 g

(Hund Nr. 1)

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge cem	1.5		4.0	10.0	3.5	2.0
freie HCl	40		70	75	70	70
Gesamtacidität	50		80	90	90	90
Pepsin	250		250	250	250	250

f) 0.01 g

(Hund Nr. 1)

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.	IV St.
Menge cem	2.0		3.0	5.5	2.5	2.0
freie HCl	40		50	70	70	70
Gesamtacidität	60		60	80	80	80
Pepsin	125		125	125	125	125

g) 0.01 g

(Hund Nr. 1)

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.
Menge ccm	1.3		6.0	10.0	2.0
freie HCl	0		90	115	90
Gesamtacidität	40		113	128	110
Pepsin	64		125	125	125

7) Versuch mit Gastrin.

Gastrin wurde nach der Methode von Bayliss und Starling (1902) hergestellt. 60 g der abgeschabten pylorischen Schleimhaut vom Schwein wurden mit 120 ccm 0.4% Salzsäure digeriert, weiter mit Sand gut zerrieben und 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die ganze Masse wurde dann 20 Minuten lang auf 70° erwärmt und mit 2 N-NaOH gegen Lakmus neutralisiert. Nach der Abkühlung wurde sie filtriert. Das Filtrat ergab ungefähr 100 ccm und war klar. 10 ccm des Filtrats wurden zur Untersuchung der Wirkung auf die Magensekretion subkutan injiziert.

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.
Menge ccm	2.5		6.0	2.4
freie HCl	90		115	100
Gesamtacidität	100		125	120
Pepsin	125		125	125

50 ccm der Gastrinlösung wurden weiter auf dem Wasserbad von 70° abgedampft. Der Rückstand wog 1.36 g. 0.3 g davon wurden in 10 ccm Wasser gelöst, von einem geringen unlöslichen Teil abfiltriert und intravenös injiziert.

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.
Menge ccm	3.0		5.0	2.0
freie HCl	90		90	90
Gesamtacidität	100		100	100
Pepsin	125		125	125

8) Versuch mit Sekretin.

Sekretin wurde ebenfalls nach der Methode von Bayliss und Starling (1902) hergestellt. Das Verfahren war dasselbe wie bei Gastrin.

10 ccm der Sekretinlösung wurden subkutan injiziert.

Zeit	1 St. vor Injektion	Injektion	I St.	II St.	III St.
Menge ccm	2.4		6.4	4.2	2.4
freie HCl	100		105	100	100
Gesamtacidität	120		120	120	120
Pepsin	125		125	125	125

B. Pankreassekretion.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen von 2000–2500 g Körpergewicht. Die Tiere wurden morgens im nüchternen Zustand mit Urethan (1 g pro kg Körpergewicht) narkotisiert, und in Rückenlage auf der Platte fixiert.

Eine feine Glaskanüle wurde in den Ductus pancreaticus durch einen mit der Schere geschnittenen Schlitz eingeführt und mit Faden befestigt. Die Tropfenzahl des ausfließenden Pankreassaftes wurde alle fünf Minuten aufgezeichnet. Messung der Sekretion mittels Tropfenzahl ergibt selbstverständlich keine absolute Menge,

da die Tropfenzahl von der Dicke der Kanüle stark abhängig ist. Aber bei einzelnen Tieren kann die Veränderung der Tropfenzahl als Mass des abgesonderten Saftvolumens dienen. Darum wurden die beobachteten Tropfenzahlen für jede Halbstunde zusammengerechnet, die Summe in der Halbstunde vor der Injektion des zu untersuchenden Mittels wurde als 100% angenommen, und die Sekretion nach der Injektion, aus der Tropfenzahl für jede Halbstunde ausgerechnet, in prozentueller Zahl angegeben. Damit konnte die individuelle Schwankung der Saftabsonderung auch ausgeschlossen werden. Die injizierte Substanz wurde in wenig Wasser gelöst, neutralisiert und subkutan zugeführt.

C. Gallensekretion.

Kaninchen und Katze dienten zum Versuch. Morgens im nüchteren Zustand wurden die Tiere wie bei den obenstehenden Versuchen narkotisiert. Die Gallenblase wurde unterbunden, eine feine Glaskanüle in den Ductus choledochus eingeführt, und die ausfliessende Lebergalle in Tropfen gezählt. Die Tropfenzahl in 10 Minuten vor der Injektion wurde als 100% angenommen und die Sekretion nach der Injektion, wie beim Pankreasversuch, in prozentuellen Zahlen angegeben.

Bei dem Versuch über die Gallensekretion hatte ich die Gelegenheit, mit dem über Pikrolonat wiederbekommenen Asparagylhistidin zu untersuchen. 1.07 g Pikrolonat wurden in 200 ccm heissen Wassers gelöst und als Lösung bis 40° abgekühlt, 20 ccm N/10 HCl hinzugefügt und stark abgekühlt. Die ausgeschiedene Pikrolonsäure wurde wiederholt ausgeäthert, das Halogen durch Silbersulfat-Baryt-Verfahren entfernt, und die Lösung unter vermindertem Druck bis 8 ccm eingeengt. 2 ccm davon wurden subkutan injiziert.

Pankreassekretion.

1. Kontrollversuche.

a) Kaninchen 2.3 kg.

Zeit	I. Halbstunde		II. Halbstunde		III. Halbstunde		IV. Halbstunde		V. Halbstunde		VI. Halbstunde	
	2. 1. 2. 2. 2. 2	2. 1. 1. 2. 1. 2	2. 1. 1. 2. 1. 1	2. 1. 1. 1. 1. 1	1. 2. 1. 1. 1. 1	1. 0. 1. 1. 0. 1	1. 0. 1. 1. 0. 1	0. 1. 0. 1. 0. 1	0. 1. 0. 1. 0. 1	0. 1. 0. 1. 0. 1	0. 1. 0. 1. 0. 1	0. 1. 0. 1. 0. 1
Tropfenzahl im 5 Minuten Intervalle	11	9	7	64	36	27	27	27	27	27	27	27
Tropfenzahl in jeder Halbstunde	11	9	7	64	36	27	27	27	27	27	27	27
%	100	82	64	36	27	27	27	27	27	27	27	27

b) Kaninchen 2.5 kg.

Zeit	6. 6. 5. 5. 6		4. 4. 4. 4. 3. 3		3. 3. 3. 4. 3. 3		3. 3. 3. 3. 3. 3		2. 2. 2. 3. 2. 2		2. 2. 2. 3. 2. 2	
	6. 6. 5. 5. 6	4. 4. 4. 4. 3. 3	4. 4. 4. 4. 3. 3	3. 3. 3. 4. 3. 3	3. 3. 3. 3. 3. 3	2. 2. 2. 3. 2. 2	2. 2. 2. 3. 2. 2	2. 2. 2. 3. 2. 2	2. 2. 2. 3. 2. 2	2. 2. 2. 3. 2. 2	2. 2. 2. 3. 2. 2	2. 2. 2. 3. 2. 2
Tropfenzahl im 5 Minuten Intervalle	34	22	19	18	13	13	13	13	13	13	13	13
Tropfenzahl in jeder Halbstunde	34	22	19	18	13	13	13	13	13	13	13	13
%	100	65	56	43	38	38	38	38	38	38	38	38

c) Kaninchen 2.5 kg.

Zeit	5. 5. 5. 4. 4. 4		3. 3. 3. 4. 3. 3		2. 2. 2. 3. 2. 2		0. 3. 2. 2. 2. 2		2. 1. 2. 2. 1. 1		1. 0. 1. 0. 1. 0	
	5. 5. 5. 4. 4. 4	3. 3. 3. 4. 3. 3	2. 2. 2. 3. 2. 2	0. 3. 2. 2. 2. 2	2. 1. 2. 2. 1. 1	1. 0. 1. 0. 1. 0	1. 0. 1. 0. 1. 0	1. 0. 1. 0. 1. 0	1. 0. 1. 0. 1. 0	1. 0. 1. 0. 1. 0	1. 0. 1. 0. 1. 0	1. 0. 1. 0. 1. 0
Tropfenzahl im 5 Minuten Intervalle	27	19	13	11	9	3	3	3	3	3	3	3
Tropfenzahl in jeder Halbstunde	27	19	13	11	9	3	3	3	3	3	3	3
%	100	70	48	41	33	11	11	11	11	11	11	11

Durchschnitt.

Zeit	100		73		56		44		36		25	
	100	73	56	44	36	25	25	25	25	25	25	25

2. Histidindichlorid 0.1 g (Kaninchen 2.5 kg)

Zeit	Injektion				
	I. Halbstunde 9.9.8.9.10.9	II. Halbstunde 8.6.8.5.9.6	III. Halbstunde 7.6.6.5.7.7	IV. Halbstunde 5.6.5.5.4.6	V. Halbstunde 4.5.4.5.4.3
Tropfenzahl im 5 Minuten Intervalle	54	42	38	31	25
Tropfenzahl in jeder Halbstunde	100	78	70	58	45
%					

3. Asparagylhistidin 0.1 g (Kaninchen 3.2 kg)

Zeit	Injektion				
	I. Halbstunde 7.13.10.15.17.15	II. Halbstunde 15.15.17.16.15.15	III. Halbstunde 12.11.12.11.11.10	IV. Halbstunde 10.8.7.8.10.8	V. Halbstunde 8.5.4.2.3.3
Tropfenzahl im 5 Minuten Intervalle	65	77	93	67	51
Tropfenzahl in jeder Halbstunde	100	118	143	103	78
%					

4. Asparagylhistidin 0.1 g (Kaninchen 2.8 kg)

Zeit	Injektion				
	I. Halbstunde 5.7.10.10.11.15	II. Halbstunde 15.17.18.17.15.17	III. Halbstunde 15.14.16.10.11.7	IV. Halbstunde 8.7.5.10.7.7	V. Halbstunde 5.5.4.3.3.2
Tropfenzahl im 5 Minuten Intervalle	54	58	99	73	44
Tropfenzahl in jeder Halbstunde	100	107	183	135	82
%					

5. Sekretin 0.1 g Asparagylhistidin 0.1 g (Kaninchen 2.4 kg)

Zeit	Injektion				
	I. Halbstunde 6.5.5.4.4.3	II. Halbstunde 11.9.8.5.4.3	III. Halbstunde 1.1.1.0.1.0	IV. Halbstunde 1.2.3.3.3.3	V. Halbstunde 3.2.2.2.1.1
Tropfenzahl im 5 Minuten Intervalle	27	40	4	15	11
Tropfenzahl in jeder Halbstunde	100	148	15	53	41
%					

Gallensekretion.

1. Kontrollversuche.

a) Kaninchen 2,5 kg

Zeit	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	61	99	70	61	37	38	28	45	36	48	44	39	5	1	1	1	0	1
%	100	154	115	100	50	50	40	74	50	79	72	51	8	2	2	2	0	2

b) Kaninchen 3,0 kg

Zeit	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	155	118	149	128	76	105	63	90	44	72	70	77	71	66	70	67	71	173
%	100	76	96	83	49	68	41	58	28	47	45	50	46	43	46	43	46	47

c) Kaninchen 2,5 kg

Zeit	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	72	60	52	49	38	29	28	27	24	21	17	15	13	13	10	10	11	11
%	100	83	72	68	53	40	39	38	33	29	24	21	18	18	14	14	15	15

Durchschnitt.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
%	100	104	94	84	51	53	40	57	37	52	47	41	24	21	27	20	20	21

2. Asparagin 0.1 g (Kaninchen 2.3 kg)

Zeit	I	II	III	Injektion			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	47	35	25				22	15	17	15	11	13	11	15	11	11	12	11	11	7	6
%	100	74	53				47	32	36	32	23	28	23	32	23	23	26	23	23	15	13

3. Sekretin 0.1 g intravenöse Injektion (Kaninchen 2.5 kg)

Zeit	I	II	III	Injektion			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	19	12	24				33	21	16	13	8	7	8	7	8	5	3	2	1	1	1
%	100	63	126				177	111	84	68	42	37	42	37	42	26	15	11	5	5	5

4. Asparagylhistidin 0.1 g Subkutane Injektion (Kaninchen 2.6 kg)

Zeit	I	II	III	Injektion			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	29	12	33				7	10	13	58	61	58	45	34	29	29	15	4	1	0	1
%	100	41	114				24	34	45	200	210	200	155	117	100	100	52	14	3	0	3

5. Asparagylhistidin 0.1 g Subkutan Injektion (Kaninchen 2.6 kg)

Zeit	I	II	III	Injektion			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XX
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	50	50	48				47	42	43	57	56	62	52	57	45	41	28	13	8	6	11
%	100	100	96				94	84	86	114	112	124	104	114	90	82	56	26	16	12	22

5. Kontrollversuche (Katze 2.3 kg)

Zeit	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
%	100	100	100	100	100	100	200	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0	0

6. Asparagylhistidin 0.1 g intravenöse Injektion (Katze 2.0 kg)

Zeit	I	II	III	Injektion										VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	0	2	1	2	2	10	10	10	10	8	5	4	2	1	4	2	1	4	2	1	1	1
%	0	200	100	200	200	1000	1000	1000	1000	800	500	400	200	100	100	100	100	100	200	100	100	100

7. Asparagylhistidin 0.1 g subkutane Injektion (Katze 1.6 kg)

Zeit	I	II	III	Injektion										VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle	1	1	1	2	2	4	4	6	5	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
%	100	100	100	200	200	400	400	400	600	500	200	100	200	100	100	100	100	100	100	100	0	100

Gallensekretion (Kaninchen 2.0 kg)

Zeit		I	II	III	Injektion										V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Tropfenzahl im 10 Minuten Intervalle		97	81	78	78	91	92	107	92	88	81	82	78	65	63	56	48	49	48						
%		100	84	80	80	94	95	110	95	91	84	85	80	67	65	58	50	51	50						

LITERATUR.

- Baumann, L. u. Ingvalden, T. (1918): J. of biolog. Chem., **35**, 263.
 Bayliss, W. M. u. Starling, E. H. (1902): J. of Physiol. **28**, 325.
 Bickel, A. u. Katsch, G. (1912): Chirurgische Thechnik zur Norm. u. Path. Physiologie des Verdauungsapparates, Berlin.
 Biilmann, E. (1900): J. f. praktische Chem., (2), **61**, 215.
 Fischer, E. u. Koenigs, E. (1904): Ber. d. deut. chem. Ges., **37**, 4599.
 Fuld, E. u. Levison, L. A. (1907): Biochem. Zs., **6**, 473.
 Gulewitsch, Wl. (1911): Zs. f. physiol. Chem., **73**, 434.
 Gulewitsch, Wl. u. Amiradzibi, S. (1900): Zs. f. physiol. Chem., **30**, 565.
 Gulewitsch, Wl. u. Krimberg, R. (1909): Hoppe-Seylers Handbuch d. physiol. u. pathol. chem. Analyse. 758.
 Hanke, T. M. u. Koessler, K. (1920): J. of biolog. Chem. **43**, 521.
 Kaplansky, S. (1926): Zs. f. physiol. Chem., **158**, 19.
 Klebs, E. (1893): Ber. d. deut. chem. Ges. **26**, 2264.
 Korchow, A. (1927): Biochem. Zs., **190**, 188.
 Krimberg, R. (1906): Zs. f. physiol. Chem., **48**, 412.
 Krimberg, R. (1925): Biochem. Zs. **157**, 188.
 Krimberg, R. u. Komarow, S. A. (1926): Biochem. Zs., **171**, 169.
 Dieselben. (1926): Biochem. Zs., **176**, 73. u. 467.
 Dieselben. (1927): Biochem. Zs. **184**, 442.
 Dieselben. (1928): Biochem. Zs., **194**, 410.
 Nakashima, R. (1927): J. of Biochem. **7**, 399.
 Rice, F. E. (1915): J. americ. Chem. Soc. **37**, 1319.
 Rosenkow, P., Derwies, G. W. u. Ssewerin, S. E. (1927): Zs. f. physiol. Chem. **162**, 95.
 Suzuki, K. (1931): J of Biochem. **13**, 57.
 Waldschmidt-Leitz, E. (1927): Zs. f. physiol. Chem., **171**, 299.
 Winterstein, E. u. K  ng, Alb. (1909): Zs. f. physiol. Chem., **59**, 145.

THE FATE OF THE GLYOXALS IN THE ANIMAL BODY.

By

FUTOSHI SAKUMA.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical School, Niigata.
Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, February 10, 1931)

There has gradually been accumulated a train of evidence *in vitro* which has been interpreted in support of the assumption that methylglyoxal might well be considered as the mother substance of lactic acid in the sugar metabolism. Nevertheless, an important part of the problem remains to be elucidated, namely the study of methylglyoxal *in vivo*. This lack of evidence *in vivo* seems to have originated in the violent toxicity of methylglyoxal and the difficulty with which a very small amount of it, if present in the blood, is determined quantitatively. It is no wonder that methylglyoxal, a highly reactive ketoaldehyde, cannot be detected in the normal course of sugar degradation, where it will suffer further change as soon as it is produced, and much more so when we have not a sensitive method for its detection.

By reference to the literature it appears that conclusive results have not been achieved with regard to the toxicity of methylglyoxal and its homologues. Dakin and Dudley (1913) found that 1.5 gm. of methylglyoxal in aqueous solution were given subcutaneously to a rabbit of 1.5 kilo. in body weight without any effect, showing that it was relatively non-toxic. Sjollem and Seekles (1926) noticed that an intravenous injection of 0.3 gm. of methylglyoxal per kilo. of body weight killed the rabbit under the development of characteristic symptoms due to motory irritation, and that one gram of methylglyoxal per kilo. was sublethal when applied subcutaneously, while 1.5 gm. per kilo., given *per os*, were fatal. Fischler and Hirsch (1928) observed that an intravenous injection

tion of 0.2 gm. of methylglyoxal in the rabbit was always productive of a set of symptoms which had striking similarity with those following the injection of insulin to normal animals. According to Pohl's description (1896) 0.2 gm. of glyoxal, given subcutaneously, is toxic enough to kill a 7 kilo. dog, and its bisulfite compound leads a rabbit of 1050 gm. to death within 24 hours. Kermack, Lambie and Slater (1927) found the lethal dose of hydroxymethylglyoxal for the mouse to be 0.75 mgm. per gram of body weight. With regard to the toxicity of glucosone, Hynd (1927) pointed out that there was a narrow margin between the sublethal and lethal dose for the mouse, the former dose being 2.4 mgm. and the latter 2.6 mgm. per gram of body weight. Herring and Hynd (1928) claim that the fatal dose of glucosone is 2.6 mgm. per gram of body weight for mice (subcutaneous), 2 mgm. for white rats (subcutaneous), 2.39 mgm. for rabbits (intraperitoneal), 2.95 mgm. for guinea pigs (intraperitoneal) and 5 mgm. for cats (subcutaneous). Arai and Takagaki (1930) also noticed the toxic effect of glucosone when injected subcutaneously in the mouse in an amount of 10 mgm. per 10 gm. of body weight, while 5-6 mgm. were without any effect. The lack of unanimity in the toxicity of the glyoxals, which is found in the literature on this subject, is very probably due to the purity of the samples (some of the preparations are always more or less acidic), the accuracy of the measuring method, etc. As to the fate of the glyoxals introduced in the living organism, there has so far been found no definite information. Dakin and Dudley (l. c.) state that the oral administration of 9 gm. of methylglyoxal to the phlorhizinised dogs resulted in the marked rise of D:N, and that no unchanged methylglyoxal was excreted in the urine. An occasional rise of blood sugar and appearance of lactic acid in the urine were found by Sjollem and Seekles (l. c.) after the injection of methylglyoxal to the rabbit. The amount of increased sugar was, however, too high to be accounted for by the quantity of methylglyoxal injected. The observation of Fischler and Hirsch (l. c.) that the blood sugar curves of the rabbit showed a temporary

depression 10 minutes after the injection of methylglyoxal and that the symptoms following the methylglyoxal injection disappeared quite rapidly, led them to think that methylglyoxal might leave the body pretty soon. Fischler (1927) also assumed for a similar reason the rapid elimination of methylglyoxal from the organism. Arai and his associate (l. c.) were able to demonstrate the appearance of a small quantity of glucosone in the urine after its intravenous application to rabbits, by detecting a substance which reacted with phenylhydrazine in the cold and formed an osazone (melting point = 203°). Based on the striking similarity between the symptoms produced by the injection of methylglyoxal and those resulting from the injection of insulin, Fischler (l. c.) tried to attribute the toxic effect of insulin to the rapid formation of methylglyoxal from glucose by insulin. On the other hand, Kermack, Lambie and Slater (l. c.) failed to revive a rabbit doomed by an injection of insulin by means of methylglyoxal and they were led to believe even in the ill effect of methylglyoxal on insulin convulsion. Hynd (l. c.), and Herring and Hynd (l. c.) found that the injection of glucosone to various animals caused the appearance of symptoms similar to those associated with insulin hypoglycemia in the same species and they suggested that glucosone was the compound directly responsible for the appearance of these symptoms. Showing that hydroxymethylglyoxal, which is to be regarded as a homologue of glucosone, produces also similar toxic effects as glucosone, Kermack, Lambie and Slater (1929) hesitate to attribute rashly the toxicity of insulin to the production of glucosone from sugar. Arai and his co-worker (l. c.) could not verify Herring and Hynd's assumption, as they failed to cure animals from insulin-convulsion by injecting glucosone. After all, in the absence, so far, of much direct experimental evidence, views on the fate of methylglyoxal and its homologues are of necessity largely speculative.

The interest which is attached to the current problem on methylglyoxal seemed to warrant a further investigation of its

behaviour *in vivo*. The present writer did not confine his investigations to methylglyoxal alone but extended the examination to its homologues, i. e. glyoxal, phenylglyoxal, hydroxymethylglyoxal and glucosone to study their toxic action and their fate in the animal body.

I. THE PREPARATION AND THE DETERMINATION OF GLYOXALS.

Methylglyoxal was prepared from dihydroxyacetone by the method of Fischer and Taube (1924) or of Fischer and Feldmann (1929). The concentration of its solution was checked by the parallel determination of the amount of acids (acetic and formic) formed from methylglyoxal by the action of H_2O_2 in alkaline medium and of the weight of its p-nitrophenylosazone. Fairly equal results were obtained by both methods. The samples were more or less acidic, being accompanied by lactic acid and others. Glyoxal was prepared by the de Forcrand method (1884) of oxidizing paraldehyde with nitric acid and distilling the resulting mixture *in vacuo*. The standardization of its solution was performed in the same fashion as in the case of methylglyoxal. The preparation was somewhat acid. Phenylglyoxal was obtained from isonitroso-acetophenone according to the method of Müller and Pechmann (1889). The purity of the preparation was confirmed from its melting point (91°). The procedure of preparing hydroxymethylglyoxal followed the lines prescribed by Evans and Waring (1926), by oxidizing dihydroxyacetone with cupric acetate. The melting point of the sample was in accord with that found in the text book (99°). Finally glucosone was prepared by the well-known method of Fischer (1889). The concentration of the glucosone solution, which was slightly acid, was estimated from the weight of its phenylosazone. Every effort was made to prepare the purest samples. The concentration of the solutions of the glyoxals might be considered accurate with the exception of glycosone, the osazone method of which shows only the approximate figures.

The determination of the glyoxals was performed by the colorimetric method of Ariyama (1928).

First of all the color intensity of the glyoxals produced by the reagents was compared. To 10 cc. of 0.001 m solution of the glyoxals were added, in order, 2 cc. of arsenophosphotungstic acid reagent, followed by 1 cc. of m NaCN and 5 cc. of m Na₂CO₃. After standing for 10 minutes the mixtures were diluted to 100 cc. with water and the depth of the blue color was compared one with another. When the color intensity of glyoxal solution was taken as unity, that of methylglyoxal was 0.75, phenylglyoxal 0.675, hydroxymethylglyoxal 0.418 and glucosone 0.413. This ratio was found to be constant at any other concentration than 0.001 m.

II. THE HYDROLYSIS OF THE GLYOXALS BY ALKALI AND GLYOXALASE.

As it seemed likely that a knowledge of the behaviour of the glyoxals towards hydrolyzing agents might throw some light on their fate in the organism, the resistance of these substances against hydrolysis was studied. It has been confirmed by many investigators that the glyoxals, though stable in acid reaction, are highly susceptible to alkali. The effect of alkalinity on the glyoxals was studied in my experiments in the following way. 10 cc. of 0.1 m solutions of the glyoxals were diluted to 100 cc. with carbonate-bicarbonate buffer solutions of pH 8.35, 9.45 and 10.45, and the mixtures were kept at 37° to examine the rate of the decrease of the substances at intervals. The results are summarized in Table I.

It will be seen from the table that the susceptibility of the glyoxals towards alkali increased at every pH in the order named, glucosone, hydroxymethylglyoxal, phenylglyoxal and methylglyoxal. Glyoxal is to be regarded as an exception, the resistance of which was the strongest among the glyoxals at lower alkalinity (pH 8.35), while it diminished greatly at higher alkalinity (pH 9.45 and 10.45) to show the intermediate value between those of hydroxymethylglyoxal and phenylglyoxal.

TABLE I.
Hydrolysis of Glyoxals at Various pH.

pH	Glyoxals	Decrease of glyoxals (%)				
		After 0.5 hr.	1 hr.	2 hrs.	3 hrs.	6 hrs.
8.35	Glyoxal	—	—	3.2	5.6	8.5
	Glucosone	—	—	7.1	11.4	14.3
	Hydroxymethylglyoxal	—	—	7.1	12.4	17.3
	Phenylglyoxal	—	—	11.2	22.8	30.5
	Methylglyoxal	—	—	15.5	27.7	38.5
9.45	Glucosone	—	8.3	14.5	22.6	29.4
	Hydroxymethylglyoxal	—	12.6	20.4	29.3	33.2
	Glyoxal	—	16.9	32.3	54.8	69.7
	Phenylglyoxal	—	20.0	33.4	57.2	73.1
	Methylglyoxal	—	25.3	37.4	59.2	78.3
10.45	Glucosone	13.5	28.7	45.6	73.1	91.4
	Hydroxymethylglyoxal	17.7	38.7	77.5	—	—
	Glyoxal	43.2	86.6	91.8	—	—
	Phenylglyoxal	44.4	69.2	93.6	—	—
	Methylglyoxal	58.1	83.2	96.0	—	—

The velocity of the hydrolysis of the glyoxals by glyoxalase, which exists in animal and plant tissues and converts the glyoxals to corresponding hydroxy acids, was compared one with another in the following fashion. The glyoxalase solution was prepared by extracting the fresh liver hash of the rabbit with 4 parts of water and filtering the mixture after an hour's standing at room temperature. The mixtures of 3 cc. of 0.1 m glyoxals and 4 cc. of the glyoxalase solution were diluted to 100 cc. with a borax-boric acid buffer solution of pH 7.0 and incubated at 37°. At intervals portions of the mixtures were pipetted out, deproteinized with trichloroacetic acid and the amount of methylglyoxal remaining was determined. The data obtained are shown in the following table.

TABLE II.
Hydrolysis of Glyoxals by Glyoxalase.

Glyoxals	Decrease of glyoxals (%)			
	After 10 min.	20 min.	40 min.	60 min.
Glyoxal	4.6	8.9	13.7	17.1
Glucosone	7.6	14.3	25.1	31.0
Hydroxymethylglyoxal	12.4	20.5	32.4	42.3
Phenylglyoxal	15.0	25.2	37.8	43.8
Methylglyoxal	24.3	43.1	70.6	89.5

When the glyoxals are arranged in the order of their susceptibility towards glyoxalase, the order falls in the same line as in the case of alkali hydrolysis.

III. THE TOXICITY OF THE GLYOXALS.

It has been observed by many investigators that the administration of a certain amount of the glyoxals produces a train of characteristic symptoms, which appears to be due to the irritation of the motory centrum. Upon intravenous injection of relatively large quantities of the glyoxals the immediate development of severe symptoms was noticed in my experiments; i.e. screaming, gasping respiration, myosis, stiffening of the tail, convulsive seizures with paddling and running movements, followed by death or slow recovery. When the doses were relatively small or the injection was made subcutaneously, the symptoms were: uneasiness, trembling, loss of appetite, drowsiness, loss of muscular tone, collapse, etc.

The lethal doses of the glyoxals for the rabbit are listed in Table III. The solutions of the glyoxals were, if necessary, neutralized with Na_2CO_3 and diluted to proper concentration before the injections were made.

As is shown in the table, the lethal doses of the glyoxals were somewhat less than those described in literature.

TABLE III.
Lethal Doses of Glyoxals for Rabbit.

Injection	Grams per kilo. of body weight.				
	Glyoxal	Methylglyoxal	Phenylglyoxal	Glucosone	Hydroxymethylglyoxal
Intravenous	0.015	0.15	0.15	0.18	0.20
Subcutaneous	0.2	0.5	—	1.5	1.8

In passing, a few remarks on the effect of lactic and pyruvic acid on the organism are inserted. The present writer confirmed the old observations with reference to the toxicity of these acids. The intravenous injection of the acids in amounts corresponding to the sublethal doses of methylglyoxal developed symptoms, which had much resemblance to those of methylglyoxal but with worse prognosis. Thus, an intravenous injection of 0.125 gm. of the acids ($=\pm 0.1$ gm. methylglyoxal) per kilo., which had been diluted to 10 cc. with water and neutralized with 0.1 n NaOH, resulted in the death of the rabbit after 24 hours, or slow recovery from severe symptoms. An injection of 0.19 gm. of the acids ($=\pm 0.15$ gm. methylglyoxal) per kilo. caused the immediate death of the animal. It is plausible that the toxicity of methylglyoxal may be due partly to the rash production of lactic acid from methylglyoxal injected.

IV. THE FATE OF THE GLYOXALS IN THE ORGANISM.

One of the ways leading to the understanding of the fate of the glyoxals in the animal body is the hourly trailing of the glyoxals introduced into the body, though it does not afford any direct clue to the nature of the chemistry involved. For this purpose the Ariyama method has proved to be of value, as it responds to a very small amount of the glyoxals with fair accuracy. At the same time as the determination of the glyoxals in the blood, the increase of blood sugar and the excretion of the glyoxals in the urine were also examined. In the case of methylglyoxal the study was ex-

tended to the investigation of lactic acid in the blood and urine. The rabbits were starved for 24 hours before the experiment. The blood sample was punctured out of Vena jugularis which had been previously exposed. This operation did not effect any noticeable influence on the sugar or lactic acid content of the blood. For the determination of the glyoxals or lactic acid 2 cc. of the blood were treated with 2 cc. of 10% trichlor-acetic acid and 6 cc. of water. 4 cc. of the deproteinized filtrate were analysed by the colorimetric method for the glyoxals and by the method of Friedemann, Cotonio and Shaffer (1927) for lactic acid. Sugar was determined by Somogyi's method (1926) in the Folin-Wu filtrate of 0.2 cc. of the blood. In the control experiments it was found that the normal blood contained some substances, probably uric acid and others, which reacted with the color reagents, and that the amount of the substances corresponded to 1.4 mgm. of methylglyoxal per 100 cc. of the blood. The values summarised in the following tables are those obtained for one particular case out of several experiments in each series. Too rigid a value cannot be placed on the determination of the glyoxals under the conditions where exceedingly small amount of the glyoxals are to be measured. The data are only of approximate value.

A. METHYLGLYOXAL.

a. Subcutaneous injection.

1.4 mol solution of methylglyoxal was carefully neutralized with Na_2CO_3 . The portions, which contained 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 gm. of methylglyoxal per kilo. of body weight respectively, were diluted with water (so as to make the solutions not exceedingly hypertonic) and injected slowly in the back of the animal. The results of the blood analyses are shown in Table IV.

From the data listed in the table much that has hitherto been obscure is now made clear. It should be emphasised that methylglyoxal stayed in the blood for rather a long time; an unexpected

TABLE IV.
Subcutaneous Injection of Methylglyoxal.

Amount injected. gm. per kilo.	Body weight (kilo.)	Substance determined in the blood	Milligrams per 100 cc. of blood					
			Before the injection	After 1 hr.	2 hrs.	4 hrs.	6 hrs.	8 hrs.
0.2	2.0	Methylglyoxal	0	0.9	1.1	0.6	0.2	0
		Sugar	91	134	142	117	97	90
		Lactic acid	22	22.7	27.0	42.7	27.0	21
0.3	1.9	Methylglyoxal	0	1.3	1.5	0.9	0.8	0.6
		Sugar	95	142	159	176	142	95
		Lactic acid	24	34	40	47	44	38
0.4	2.0	Methylglyoxal	0	1.8	2.1	1.2	0.9	—
0.5	2.2	Methylglyoxal	0	3.4	—	3.6	dead	

result, in view of the susceptibility of methylglyoxal to glyoxalase and of the rapid disappearance of the toxic symptoms. Methylglyoxal in the blood increased rapidly till the second hour after the injection, followed by a fast decrease and disappeared after 8 hours or more. Lactic acid showed the maximum value at the 4th hour and then diminished rapidly. The blood sugar curve rose up rapidly and reached the maximum point after 2 or 4 hours and returned to its normal value after 6 or 8 hours. Because of the lack of the reducing power of methylglyoxal in such small amounts as were detected in the blood, the rise of the reducing power must be attributed to the actual increase of blood sugar.

b. Intravenous injection.

0.5, 1.0 and 1.5 cc. of 1.4 m methylglyoxal solution ($=0.05$, 0.1 and 0.15 gm. methylglyoxal) per kilo. were injected slowly after neutralizing and diluting.

Here again we noticed rather a long stay of methylglyoxal in

TABLE V.
Intravenous Injection of Methylglyoxal.

Amount injected. gm. per kilo.	Body weight (kilo.)	Substance determined in the blood	Milligrams per 100 cc. of blood					
			Before the injection	After 5 min.	1 hr.	2 hrs.	4 hrs.	6 hrs.
0.05	2.4	Methylglyoxal	0	0.9	—	0.3	0.2	0
		Sugar	107	117	150	125	108	91
		Lactic acid	28	—	52	51	45	33
0.10	2.3	Methylglyoxal	0	1.6	1.2	0.8	0.4	±0
		Sugar	108	157	176	186	193	151
		Lactic acid	24	—	58	56	51	41
0.15	2.0	Methylglyoxal	0	3.2	3.1	3.1	dead	

the blood, though the curves of its elimination from the blood fell quite abruptly. Lactic acid sprang up to the highest point an hour after the injection and then decreased relatively by degrees. The blood sugar increased more slowly than the lactic acid.

It is worth while to note that methylglyoxal was never excreted in the urine under any circumstances. Three successive injections of 0.1 gm. (intravenously) or 0.3 gm. (subcutaneously) per kilo. at intervals of 3 hours did not cause the excretion of methylglyoxal in the urine. This may be accounted for by the great sensitivity of methylglyoxal towards tissue glyoxalase. The urine of the normal rabbit contained some substances which developed the blue color with the color reagents; the amount of the substances in 100 cc. of the urine corresponded to 4.3–4.5 mgm. of methylglyoxal. The extra lactic acid and sugar leaked out of the blood stream to the urine. The hourly relation between lactic acid and sugar of the blood and urine after the intravenous injection of 0.1 gm. of methylglyoxal per kilo. into a rabbit of 1500 gm. is shown in Table VI. The samples of the urine were catheterized out of the bladder at intervals.

TABLE VI.
Lactic Acid and Sugar in Blood and Urine after Intravenous
Injection of Methylglyoxal.

	Substance determined	Amount, in 100 cc. of blood or excreted in the urine (mgm.)					
		Before the injection	After 2 hrs.	4 hrs.	6 hrs.	8 hrs.	24 hrs.
Blood	Methylglyoxal	0	1.2	0.9	± 0	0	0
	Sugar	89	186	193	127	108	90
	Lactic acid	24	56	42	32	24	24
Urine	Methylglyoxal	0	0	0	0	0	0
	Sugar	0	19.4	39.8	82.9	117.4	217.2
	Lactic acid	0	2.7	8.3	18.5	29.9	38.3

Fischler's assumption that the rash formation of methylglyoxal in the blood might be directly responsible for the hypoglycemic convulsion of insulin was disproven. No trace of methylglyoxal was detected in the blood of the insulin-convulsive animal, and the injection of glucose or dihydroxyacetone did not alleviate the symptoms arising as a result of the injection of methylglyoxal.

B. GLYOXAL.

Injections were performed in the same fashion as in the case of methylglyoxal (Table VII).

a. Subcutaneous injection.

The apexes of the curves for glyoxal in the blood were reached at the second hour after the injection. The blood sugar curves fell almost in the same family as those of glyoxal. In such small amounts as were present in the blood, glyoxal was not responsible for reduction of the sugar reagent.

b. Intravenous injection.

Glyoxal of the blood fell with great rapidity and was eliminated

TABLE VII.
Subcutaneous and Intravenous Injection of Glyoxal.

Injection	Amount injected, gm. per kilo.	Body weight (kilo.)	Substance determined in the blood	Milligrams per 100 cc. of blood					
				Before the injection	After 5 min.	1 hr.	2 hrs.	4 hrs.	6 hrs.
Subcutaneous	0.05	2.0	{ Glyoxal	0	—	0.12	0.5	0	0
			{ Sugar	91	—	117	125	100	90
	0.1	2.3	{ Glyoxal	0	—	0.3	1.3	±0	0
			{ Sugar	83	—	142	159	125	81
	0.2	2.3	{ Glyoxal	0	—	0.5	1.56	0.8	dead
			{ Sugar	87	—	142	168	176	
	0.5	2.0	{ Glyoxal	0	—	0.75	2.25	dead	
			{ Sugar	91	—	168	185		
Intravenous	0.005	2.3	{ Glyoxal	0	0.6	—	0.3	0	0
			{ Sugar	83	125	—	117	108	79
	0.01	2.1	{ Glyoxal	0	1.4	—	0.5	±0	0
			{ Sugar	89	142	—	159	117	91
	0.025	2.3	Glyoxal	0	9.0	dead			
	0.05	2.3	Glyoxal	0	16.2	dead after 10 min.			

completely after 4 hours while the blood sugar reached the highest point after one or two hours and reached its original value after a lapse of 6 hours.

Contrary to methylglyoxal, the injection of a relatively large amount of glyoxal caused its appearance in the urine. Thus three successive injections of 0.01 gm. glyoxal per kilo. intravenously at intervals of 3 hours caused in two experiments the excretion of 1.52 and 1.24 mgm. of glyoxal within 24 hours.

C. PHENYLGLYOXAL.

Owing to the scantiness of the sample the experiments had to be limited to the intravenous injection alone.

TABLE VIII.
Intravenous Injection of Phenylglyoxal.

Amount injected, gm. per kilo.	Body weight (kilo.)	Substance determined in the blood	Milligrams per 100 cc. of blood						
			Before the injec- tion	After 5 min.	1 hr.	2 hrs.	4 hrs.	6 hrs.	8 hrs.
0.05	2.3	{ Phenylglyoxal	0	1.1	0.7	0.4	±0	0	—
		{ Sugar	91	—	117	108	100	90	—
0.1	2.3	{ Phenylglyoxal	0	1.8	1.4	1.1	0.5	±0	0
		{ Sugar	83	—	137	142	117	100	85
0.12	2.0	{ Phenylglyoxal	0	2.1	1.8	1.4	0.7	1.4	0
		{ Sugar	91	—	143	157	150	134	117
0.15	2.1	{ Phenylglyoxal	0	6.4	dead after 10 min.				
		{ Sugar	—	—					

On comparison with the corresponding case of methylglyoxal, the elimination of phenylglyoxal took place a little more slowly.

D. HYDROXYMETHYLGLYOXAL.

There was a marked difference between the velocity of decrease of hydroxymethylglyoxal and methylglyoxal in the blood, the latter disappearing more rapidly (Table IX).

When 0.1 gm. of hydroxymethylglyoxal per kilo. was injected intravenously three times in succession at intervals of 3 hours, a small quantity of it was excreted. 5.4 and 4.2 mgm. of hydroxymethylglyoxal were found within 24 hours in two samples of the urine.

E. GLUCOSONE.

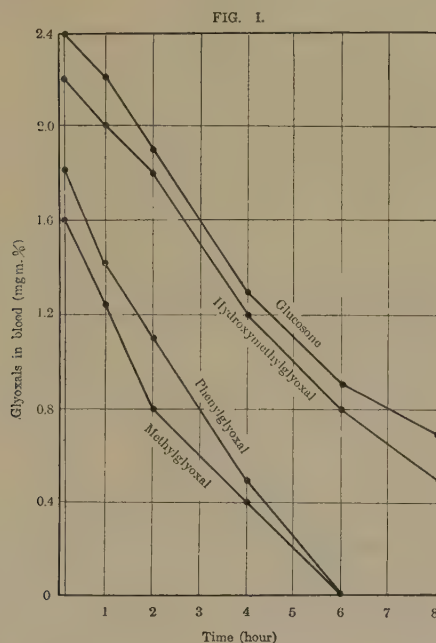
The slowest elimination of glycosone among the glyoxal derivatives was found. This was to be expected previously from its relatively strong resistance against glyoxalase (Table X).

TABLE IX.
Subcutaneous and Intravenous Injection of Hydroxymethylglyoxal.

Injection	Amount injected gm. pro kilo.	Body weight (kilo.)	Substance determined in the blood	Milligrams per 100 cc. of blood						
				Before the injection	After 5 min.	1 hr.	2 hrs.	4 hrs.	6 hrs.	8 hrs.
Subcutaneous	0.2	2.3	{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	0	—	2.6	2.7	2.3	2.0	1.9
			{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	87	—	117	154	126	91	87
	0.3	2.4	{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	0	—	3.0	3.3	3.0	2.7	2.6
			{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	91	—	148	175	142	125	117
Intravenous	0.05	2.0	{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	0	1.7	1.6	1.3	0.8	0.5	±0
			{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	91	—	134	125	117	100	90
	0.10	2.0	{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	0	2.2	2.0	1.8	1.2	0.8	0.5
			{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	103	—	142	150	134	117	98
	0.15	2.0	{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	0	2.8	2.5	2.3	1.8	1.1	0.8
			{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	97	—	150	168	17.6	125	100
	0.20	1.8	{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	0	4.3	4.1	4.1	dead		
			{ Hydroxy- methylglyoxal Sugar	91	—	176	185			

TABLE X.
Subcutaneous and Intravenous Injection of Glucosone.

Injection	Amount injected gm. pro kilo.	Body weight (kilo.)	Substance determined in the blood	Before the injection	Milligrams per 100 cc. of blood					
					After 5 min.	1 hr.	2 hrs.	4 hrs.	6 hrs.	8 hrs.
Subcutaneous	0.2	2.2	{ Glucosone Sugar	0	—	1.2	1.5	1.2	0.7	0.5
				91	—	128	142	104	93	89
	0.3	2.3	{ Glucosone Sugar	0	—	2.0	2.3	2.2	1.7	1.4
				103	—	134	149	168	102	94
	1.0	2.0	Glucosone	0	—	2.6	3.6	3.3	2.8	2.4
	1.5	2.3	Glucosone	0	—	5.2	dead			
Intravenous	0.05	2.3	{ Glucosone Sugar	0	1.7	1.6	1.3	0.9	0.6	±0
				83	—	127	109	102	92	85
	0.10	2.0	{ Glucosone Sugar	0	2.4	2.2	1.9	1.3	0.9	0.7
				91	—	139	153	117	100	88
	0.15	2.3	{ Glucosone Sugar	0	2.9	2.6	2.2	1.6	1.3	0.6
				108	—	143	132	178	117	108
	0.18	2.5	Glucosone	0	3.7	dead after 8 min.				



In two experiments, in which the animals received successively 3 intravenous injections of 0.1 gm. glucosone per kilo. at intervals of 3 hours, 7.4 and 9.3 mgm. of glycosone were excreted in 24 hours.

To illustrate the rate of elimination of the glyoxals from the blood, Fig. 1 has been prepared from the data obtained in the cases of intravenous injection of 0.1 gm. of the glyoxals per kilo. by plotting in a diagram the amounts of the glyoxals present in the blood against time. The order of the velocity of the decrease of the glyoxals conforms to that of their susceptibility towards hydrolysis.

SUMMARY.

1. The susceptibility of the glyoxals to hydrolysis by alkali and glyoxalase was studied. They were, arranged in the order of

sensibility, methylglyoxal, phenylglyoxal, hydroxymethylglyoxal, glucosone and glyoxal.

2. The lethal doses of the glyoxals for the rabbit were determined by injecting them subcutaneously and intravenously.

3. The fate of the glyoxals in the animal body was examined by analysing the blood and urine for their content of glyoxals, lactic acid and sugar. The finding that the injected glyoxals existed in the blood for a much longer time than was hitherto supposed, was a rather unexpected result, in view of their reactivity and of their susceptibility towards glyoxalase.

REFERENCES

- Arai, M. and Takagaki, S. (1930): *Nippon Naikwagakukwai Zasshi*, **18**, 199.
- Ariyama, N. (1928): *J. Biol. Chem.*, **77**, 359.
- Dakin, H. D. and Dudley, H. W. (1913): *J. Biol. Chem.*, **15**, 127.
- de Forcerand (1884): *Bull. Soc. Chim. de Paris*, **41**, 240.
- Fischer, E. (1889): *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **22**, 87.
- Fischer, H. O. L. and Feldmann, L. (1929): *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **62**, 834.
- Fischer, H. O. L. and Taube, C. (1924): *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **57**, 1502.
- Fischler, F. (1927): *Z. f. physiol. Chem.*, **165**, 68.
- Fischler, F. and Hirsch, O. (1928): *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **127**, 287.
- Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer, P. A. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 335.
- Herring, P. T. and Hynd, A. (1928): *J. Physiol.*, **66**, 267.
- Hynd, A. (1927): *Proc. Roy. Soc., B.*, **101**, 244.
- Kermack, W. O., Lambie, C. G. and Slater, R. H. (1927): *Biochem. J.*, **21**, 40; (1929), **23**, 410.
- Müller, H. and Pechmann, H. (1889): *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **22**, 2556.
- Pohl, J. (1296): *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **37**, 413.
- Sjollema, B. and Seekles, L. (1926): *Biochem. Z.*, **176**, 431.
- Somogyi, M. (1926): *J. Biol. Chem.*, **70**, 599.

A COLD-HEMOTOXIN, NEWLY DISCOVERED IN THE HEATED SERUM.

Part II.

The Cold, Non-Complementary Hemolysis by the Heated Normal Serum.

By

KATSUO TOSHIMA.

(From the Department of Forensic Medicine, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan. Director: Prof. K. Yamakami.)

(Received for publication, March 1, 1931)

INTRODUCTION.

In the previous paper (Toshima, 1931) I have described the discovery of a new sort of cold-hemolysis shown by the heated immune hemoagglutinin serum.

The principle causing the cold-hemolysis in the heated serum is not a compound hemolysin but it does not require any assistance of hemolytic complement in destroying the erythrocytes, and is to be classified as a hemotoxin.

In the course of immunization of rabbits with various sorts of erythrocytes, the production of cold-hemotoxin takes place in a relatively earlier stage and disappears very quickly compared with other immune bodies such as hemoagglutinin, hemolytic amboceptor in the general sense, etc..

In the case of immune sera, the suitable temperature for the manifestation of the strongest cold-hemolytic power lies between 70–100°C, and no hemolysis occurs in the serum heated at 60–65°C.

The hemolysis does not take place at 37°C, but a remarkable hemolysis occurs at temperatures lower than 5°C.

Though I have reported the cold, non-complementary hemolysis by the heated immune serum in the first paper, on account of the

circumstance that it has been first discovered and studied in the heated immune serum, but I could later demonstrate the fact that a similar sort of cold-hemolysis seen in the heated normal serum is also, though in a weaker degree, compared with that in the immune serum.

The present paper deals with the results of investigation of the cold-hemolysis by the heated normal serum.

MATERIALS OF THE EXPERIMENTS

As experimental materials, the clear, fresh normal sera of healthy rabbits, chickens, pigs, cattle, horses, ducks, geese, men, etc., which have been obtained in the hungry hour of animals in order to prevent the turbidity of serum, were employed.

The erythrocytes (rabbit, chicken, pig, cattle, horse, duck, goose, man, guinea-pig, pigeon) were always obtained fresh on the day of the experiment, employing a 10% solution of sodium citrate as anti-coagulant. They were washed thoroughly and suspended in the saline solution to 5% emulsion.

TECHNIQUE OF EXPERIMENTS.

The above mentioned normal sera were previously diluted at suitable rates with the physiological salt solution to prevent the heat coagulation of serum protein. The coagulation could be prevented by diluting the serum to $\frac{1}{5}$, when it was to be heated at 70–75°C, to 1/10 when to be heated at 80–90°C, and to 1/12 for heating at 95–100°C.

To 0.45 cc. of these heated sera, one drop of 5% emulsion of various sorts of erythrocytes was added. After these materials had been thoroughly mixed, the mixture was placed at 37°C (in the incubator), 22°C (room temperature), 5°C (in the ice-box) and 0°C (in ice water) for 6 hours.

And then the results were examined. As the control test, the erythrocytes suspended in the salt solution were always experimented with in the same way.

Results of Experiments.

I. THE SPECIES OF ANIMALS AND THE COLD-HEMOLYSIS BY THE HEATED NORMAL SERUM.

When the normal serum is heated at various temperatures and various kinds of erythrocytes are added into it, the cold-hemolysis generally takes place in those sera that have been heated at 70°C to 100°C. But the degree of cold-hemolysis differs greatly with various kinds of sera as well as of erythrocytes used.

Generally speaking, the cold-hemolysis caused by the heated normal sera is always remarkably weaker than that caused by the heated immune sera.

Furthermore, the normal sera seem to require a higher degree of heating temperature for producing the strongest power of cold-hemolysis compared with the immune sera.

In the case of immune sera, the strongest hemolysis occurs generally in those sera that have been heated at 75–80°C, while the normal sera manifest the strongest cold-hemolytic power when they have been heated at 90°C, the degree of hemolysis being gradually weaker in sera that have been less and more strongly heated than this.

The normal sera of cattle, horse, duck, and goose cause the strongest cold-hemolysis when heated at temperatures near 100°C. As in the case of heated immune sera, the temperature at which the hemolysis occurs, is very characteristic; that is, the lower the temperature, the stronger the hemolysis. Neither at 37°C nor at 22°C, the hemolysis fails, and it manifests itself only at temperatures lower than 5°C. At 0°C it is the strongest.

As already mentioned, the degree of cold-hemolysis by the heated normal sera is generally very weak, and the complete hemolysis of the added erythrocytes can never be expected. The sign (+) in the tables given below, denotes such a degree of hemolysis that a narrow zone of dissolved hemoglobin can be seen over the sedimented erythrocytes, and a very slight colouring of the

supernatant fluid can be observed when the test tube is slightly shaken without disturbing the sediment of erythrocytes.

1. *Serum of rabbits.*

As will be seen in table I, the cold-hemolysis by the heated normal serum of rabbits was the strongest, when chicken erythrocytes were employed and a little weaker against the erythrocytes of pig, horse, and man.

And the serum heated at 90°C manifests the strongest hemolytic power, the cold-hemolysis in the serum heated at temperatures below 85°C, being gradually weaker.

As to the reacting temperature, the hemolysis is 2 or 3 times stronger at 0°C than at 5°C. The erythrocytes of rabbit, cattle, duck, goose, guinea-pig and pigeon are not hemolysed at any temperatures by the heated normal serum of rabbit.

2. *Serum of chickens.*

As is shown in table 1, the heated normal serum of chicken hemolyses pretty strongly the erythrocytes of pig and man, but only slightly those of chicken and cattle at 0°C. All other kinds of erythrocytes are intact in it. The relation between heating- and reacting temperatures is similar to the case of rabbit's serum.

3. *Serum of pig.*

The cold-hemolytic power of heated normal pig serum is very weak compared with the above-mentioned two sera. Only the erythrocytes of pig, cattle and horse showed a trace of cold-hemolysis in the heated pig serum.

4. *Serum of cattle.*

The heated normal serum of cattle has only a slight power of cold-hemolysis, which reacts solely with pig erythrocytes. The optimum temperature of heating is 100°C.

5. *Serum of horse and duck.*

The heated normal serum of horse and duck cause a trace of cold-hemolysis only against the erythrocytes of horse and pig.

6. *Serum of man.*

The cold-hemolytic power of the heated normal human serum is very weak. It hemolyses only the erythrocytes of chicken, pig, horse and man.

And even with these erythrocytes, the hemolysis takes place only at 0°C and is so slight that I have believed for a long time in the absence of cold-hemotoxin in the heated normal human serum.

7. *Serum of goose.*

In the heated normal serum of goose, only a slight hemolysis occurs at 0°C when the blood cells of horse are added. As heating temperatures, 95–100°C, are the most effective. The erythrocytes of chicken and pig show also a trace of cold-hemolysis.

TABLE I.
Relation between heating- and reacting temperatures.

Sorts of serum	Sorts of erythrocytes	Reacting temp. (C)	Heating temperature (C)							Contrast (NaCl)
			70°	75°	80°	85°	90°	95°	100°	
Rabbit	Chicken	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	±	+	+	+	—
		0°	—	+	+	+	+	+	+	—
	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	±	+	+	+	+	+	—
		0°	±	+	+	+	+	+	+	—
	Horse	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	±	±	+	+	±	—
		0°	—	±	±	+	+	+	+	—
	Man	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	±	±	—	—	—
		0°	—	±	±	+	+	+	+	—

TABLE (continued)

Sorts of serum	Sorts of erythrocytes	Reacting temp. (C)	Heating temperature (C)							Contrast (NaCl)
			70°	75°	80°	85°	90°	95°	100°	
Chicken	Chicken	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	—	±	±	±	—
	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	±	+	+	+	—
		0°	—	±	±	+	+	+	+	—
	Cattle	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	—	—	±	±	—
	Man	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	±	±	+	—
		0°	—	—	±	±	+	+	+	—
Pig	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	±	—	—	—
		0°	—	—	—	±	+	±	—	—
	Cattle	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	+	±	—	—
		0°	—	—	—	—	+	±	±	—
	Horse	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	±	—	—	—
		0°	—	—	—	±	±	±	—	—
Cattle	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	±	±	±	+	—
		0°	—	—	—	±	±	±	+	—
Horse	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	±	—
		0°	—	—	—	—	—	±	±	—
	Horse	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	±	—
		0°	—	—	—	—	—	±	±	—

Duck	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	±	±	+	—
		0°	—	—	—	—	+	±	+	—
	Horse	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	±	+	—
		0°	—	—	—	—	±	±	+	—
Man	Chicken	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	—	±	—	—	—
	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	—	±	±	—	—
	Horse	37°	+	—	—	—	—	—	—	—
		22°	+	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	—	±	±	±	—
	Man	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	—	±	±	—	—
Goose	Chicken	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	—	—	—	±	—
	Pig	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	—	±	—	—	—	—
	Horse	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
		22°	—	—	—	—	—	—	—	—
		5°	—	—	—	—	—	—	—	—
		0°	—	—	±	±	±	+	+	—

II. THE INFLUENCE OF LONGER HEATING UPON THE COLD-HEMOLYTIC POWER OF NORMAL SERA.

In this experiment, the influence of heating longer than 30

minutes upon the cold-hemolytic power of serum has been investigated.

The normal rabbit serum was diluted to 1/10 and heated at 90°C for various lengths of time, ranging from 1/2 to 2 hours, and its hemolytic power was determined at 0°C.

As is shown in table II, the strength of cold-hemolytic power was not noticeably influenced by changing the length of the heating time.

TABLE II.
Influence of the length of heating time.

Heating hour	½ h.	1 h.	1½ h.	2 h.
Degree of cold-hemolysis	##	##	##	##

III. LENGTH OF TIME REQUIRED FOR OBTAINING THE MAXIMUM DEGREE OF COLD-HEMOLYSIS.

In all of the experiments so far mentioned, the results were read after 6 hours. But the cold-hemolysis by the heated normal sera generally appears more quickly than in 6 hours. When the erythrocytes of chicken are added to the heated normal serum (30 minutes at 90°C) of rabbits and cooled at 0°C, a trace of hemolysis can be seen already after 20 minutes, and it goes on gradually until the maximum degree of hemolysis is reached after about 5 hours, as will be seen in table III.

TABLE III.
Length of time required for the maximum reaction.

Length of time	10 m.	20 m.	30 m.	1 h.	1½ h.	2 h.	2½ h.	3 h.	5 h.	Contrast (6 h.)
Result	—	±	+	+	+	+	+	+	+	+

m.—minute

h.—hour

IV. THE UPPER LIMIT OF REACTING TEMPERATURE.

It has been already stated that the hemolysis by the heated serum manifests itself only at low temperatures. In the case of the heated normal serum, the upper limit of reacting temperature is especially low. When the normal sera of rabbits, chickens, pig, etc., are diluted to 1/10, heated at 90–95°C for 30 minutes, and various kinds of erythrocytes are added, the upper limit of reacting temperature is 5°C for all combinations of serum and erythrocytes, and no trace of hemolysis occurs at temperatures higher than this limit, as is shown in table IV.

TABLE IV.
The upper limit of reacting temperature.

Sorts of serum	Sorts of erythrocyt.	Reacting temp. (C)	Heat. temp. (C)		Contrast (NaCl)
			90°	95°	
Rabbit	Pig	10°	—	—	—
		5°	+	+	—
	Chicken	10°	—	—	—
		5°	+	+	—
Chicken	Pig	10°	—	—	—
		5°	±	+	—
	Man	10°	—	—	—
		5°	—	±	—
Pig	Pig	10°	—	—	—
		5°	+	+	—
	Cattle	10°	—	—	—
		5°	±	±	—

V. THE INDIVIDUAL DIFFERENCE OF ANIMALS AS TO THE COLD-HEMOLYTIC POWER OF HEATED NORMAL SERUM.

As has been already mentioned, the strength of cold-hemolysis

by the heated normal serum differs with the species of animals and with the resistance of erythrocytes employed.

Beside these circumstances, the strength of cold-hemolysis varies even within one and the same species of animals, according to their individuality.

The following experiments have been made in order to demonstrate this fact.

The sera taken from 6 healthy rabbits were equally heated at 90°C for 30 minutes, chicken erythrocytes were added and they exposed to 37°, 22°, 5° and 0°C for 6 hours.

The results are shown in table V.

TABLE V.
Individual difference of animals in the degree of cold-hemolysis.

Number of rabbits	Reacting temperature (C)			
	37°	22°	5°	0°
No. 24	—	—	—	+
No. 25	—	—	—	+
No. 31	—	—	+	##
No. 40	—	—	—	++
No. 43	—	—	—	++
No. 98	—	—	+	##

It will be noticed in the table that a considerable difference exists in the degree of cold-hemolysis between each rabbit. Such is also the case with the sera of other species of animals. In the heated normal sera of man, pig, goose, etc., the cold-hemolysis is sometimes positive and sometimes negative, according to the individuality of animals.

VI. RELATIONSHIP BETWEEN THE DEGREE OF COLD-HEMOLYSIS AND THE AMOUNT OF ERYTHROCYTES EMPLOYED.

It is a well known fact that various serological reactions such as agglutination, hemolysis, etc. are greatly influenced by the

amount of erythrocytes added. I have, therefore, examined whether the degree of cold-hemolysis by the heated normal sera is also influenced by the amount of erythrocytes employed.

Rabbits' sera (No. 31 and No. 43) were diluted and heated for 30 minutes at 90°C. And to 0.45 cc. of various dilutions of heated serum, one drop of the emulsion of chicken erythrocytes of various percentages was added. After the mixture had been placed at 0°C for 6 hours, the results were examined.

As is shown in table VI, the cold-hemolysis is the strongest éhen the erythrocytes emulsion of 5–10% is employed. The amount of erythrocytes employed, éhich is both larger and smaller than this limit, results in a lesser degree of cold-hemolysis. And, moreover, too great an amount of erythrocytes lessens the titer of hemotoxin.

TABLE VI.
Influence of the quantity of erythrocytes.

Number of rabbits	Quantity of erythro. (%)	Dilution of serum				Contrast (NaCl)
		10	20	40	80	
No. 31	1.0	+	±	±	—	—
	2.5	++	+	+	—	—
	5.0	+++	++	++	—	—
	10.0	+++	+++	—	—	—
	20.0	+++	++	—	—	—
No. 43	1.0	+	±	±	—	—
	2.5	++	+	±	—	—
	5.0	++	++	±	—	—
	10.0	+++	++	—	—	—
	20.0	+++	—	—	—	—

VII. THE INFLUENCE OF FEEDING AND OF THE HUNGER STATE OF ANIMALS UPON THE STRENGTH OF COLD-HEMOTOXIN.

In this experiment, the influence of feeding and the hunger

state of animals upon the strength of cold-hemolysis by the heated normal serum has been investigated.

For this purpose, the sera were taken from three healthy rabbits at various intervals after feeding. And each sample of serum was examined as to the strength of cold-hemolysis, employing 5% emulsion of chicken erythrocytes.

The results are shown in table VII.

TABLE VII.
Influence of hunger upon the strength of cold-hemotoxin.

Number of rabbits	Hunger hour and days							
	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	3 h.	1 d.	3 d.	4 d.	5 d.
No 31	++	++	++	++	++	±	++	++
No. 43	+++	++	++	++	++	++	++	—
No. 98	+++	+++	++	++	+	++	++	—

As will be seen in the table, the strength of cold-hemotoxin in the heated serum remains without any considerable change until late in hunger days.

VIII. RELATIONSHIP BETWEEN THE COLD-HEMOTOXIN AND AND ORDINARY HEMOLYTIC AMBOCEPTOR IN SERUM.

As has been already discussed in the introduction, it is evident that the agent in the heated serum causing the cold-hemolysis has no direct concern with the compound hemolysin or the ordinary hemolytic amboceptor of serum, because the hemolytic complement as well as at least a part of hemolysin itself are destroyed by heating the serum at such high temperatures as 70–100°C.

But the possibility can not be excluded that the substance modified from the hemolysin by heating the serum may be endowed with such a property as can cause the destruction of erythrocytes at low temperatures.

The following experiments have therefore been undertaken in order to settle the problem whether the cold-hemotoxin has anything to do with the modified hemolytic amboceptor or not.

For this purpose, the hemolytic amboceptor has first been eliminated from the serum of rabbits or pigs by means of the method of so-called "cold separation" (Kältetrennungsmethode).

To 1.0 cc. of serum cooled in salted ice water, 0.1 cc. of washed erythrocytes were added, and quickly centrifuged after 30 minutes. The clear supernatant fluid was treated again in a similar way.

The serum thus obtained is free from the ordinary hemolytic amboceptor. The experiment of cold-hemolysis was made with the serum thus treated, employing the original unabsorbed serum as control.

As indicated in table VIII, the serum perfectly freed from the

TABLE VIII.
Experiment with the serum freed from the ordinary
hemolytic amboceptor.

Sort of serum	Sort of erythrocyt.	Kind of experiment	Heating temp. (C°)			Contrast (NaCl)
			80°	90°	100°	
Rabbit	Chicken	Adsorb. ser.	—	+	+	—
		Contrast	—	+	+	—
	Horse	Adsorb. ser.	±	+	±	—
		Contrast	+	+	±	—
	Pig	Adsorb. ser.	+	±	+	—
		Contrast	+	±	+	—
Pig	Horse	Adsorb. ser.	—	±	—	—
		Contrast	—	±	—	—
	Pig	Adsorb. ser.	—	±	—	—
		Contrast	—	±	—	—
	Cattle	Adsorb. ser.	—	+	—	—
		Contrast	—	+	—	—

ordinary hemolytic amboceptor by absorption, can cause the cold-hemolysis when heated at suitable temperatures. This result proves the fact that the cold-hemotoxin is not a substance which has been produced from the ordinary hemolytic amboceptor by heating the serum.

IX. THE INFLUENCE OF NEUTRAL SALTS UPON THE COLD-HEMOLYSIS.

Many serological reactions are influenced by the sorts of neutral salts in the medium. Experiment IX has, therefore, been undertaken in order to know the influence of neutral salts upon the cold-hemolysis.

For this purpose, the isotonic solutions of various neutral salts were prepared by dissolving KCl (1.2%), KNO₃ (Merck) (1.52%), K₂SO₄ (Merck) (2.15%), KBr (1.7%) and CaSO₄ (Merck) (3.98%) in equa distillata according to the list of Yoshida(1928).

The rabbit serum was diluted to 1/10 with the isotonic solutions of various neutral salts and heated for 30 minutes at 90°C. The chicken erythrocytes were carefully washed also with the same neutral salt solution.

With these experimental materials, the experiment of cold-hemolysis was performed as before in the medium of neutral salt solutions, without employing any trace of the physiological saline solution.

The results of this experiment are shown in table IX.

TABLE IX.
Influence of various neutral salts.

Sorts of neutral salts	%	Results	Contrast
KCl	1.2	##	—
KNO ₃	1.52	##	—
K ₂ SO ₄	2.15	—	—
KBr	1.7	##	—
CaSO ₄	3.98	—	—
NaCl	0.85	##	—

Among the sorts of neutral salts employed, only the sulphates (SO_4K_2 , CaSO_4) inhibit the occurrence of cold-hemolysis, and in the solutions of all other salts (KCl , KNO_3 , KBr) the cold-hemolysis manifests itself to the same degree as in the medium of physiological saline solution.

X. INFLUENCE OF THE ISOTONIC SOLUTION OF SACCHAROSE.

Many serological reactions can not take place in a medium which contains no trace of neutral salt. For instance, agglutination, hemolysis, precipitation, complement fixation, etc. can not occur in the isotonic solution of saccharose.

Experiment X was therefore made to settle the problem whether such is also the case with the cold-hemolysis by the heated serum or not. The isotonic solution of saccharose is theoretically a 7.8% aqueous solution.

The results of this experiment are shown in table X.

TABLE X.
Influence of saccharose solution.

Sorts of serum	Sorts of erythrocyt.	Reacting temp. (C)	Heat. temp. (C)		Contrast (Saccharose)
			85°	90°	
Rabbit	Chicken	{ 5°	—	—	—
		{ 0°	—	—	—
	Pig	{ 5°	—	—	—
		{ 0°	—	—	—
Pig	Pig	{ 5°	—	—	—
		{ 0°	—	—	—
Chicken	Chicken	{ 5°	—	—	—
		{ 0°	—	—	—
	Pig	{ 5°	—	—	—
		{ 0°	—	—	—

The cold-hemolysis is always negative in the saccharose solution free from neutral salts. It, therefore, obeys the general rule of serological reactions.

XI. THE COLD-HEMOLYSIS AND THE FRACTIONS OF SERUM PROTEIN.

In order to determine, in which fractions of serum protein this hemolytic substance exists, I have performed the following experiment employing the rabbit serum.

1. *Separation by carbon dioxide.*

To 2.0 cc. of rabbit serum, 8.0 cc. of aqua distillata were added. And then carbon dioxide was led from Kipp's apparatus into it until the precipitate no longer increased (about one half-hour). This precipitate consists solely of globulin. It was separated from the albumin portion by means of a centrifuge. As is well known, the globulin in the precipitate is not the whole part of serum globulin, but it is mainly euglobulin and the albumin portion is a mixture of albumin and pseudoglobulin.

Both the globulin and the albumin fractions thus obtained were experimented on as before, the results being shown in table XI.

Such experiments were repeated several times and always followed by the same results. It has been proved that the substance causing the hemolysis exists only in the albumin fraction when the serum protein is separated by CO₂ method.

2. *Separation by HCl.*

To 1.0 cc. of rabbit serum 8.2 cc. of N/250 HCl was added; after an hour at room temperature, it was separated by means of centrifuge into two portions.

The globulin fraction (i. e., the precipitate) was dissolved in the distilled water and then made to the isotonic solution of 10 times the original volume of serum by adding NaCl. The clear supernatant fluid (i. e., the albumin fraction) was neutralized by

adding 0.8 cc. of 10% NaCl solution containing N/25 NaOH. The globulin fraction is mainly euglobulin and the albumin part is the mixture of albumin and pseudoglobulin.

The results of the experiment were mostly the same as in the previous experiment but the degree of hemolysis was considerably weaker, when compared with the control.

3. Separation by ammonium sulphate.

To 2.0 cc. of rabbit serum, an equal volume of the saturated solution of ammonium sulphate was added and after a short time the mixture was separated by means of centrifuge into two portions, the liquid portion (albumin) and the precipitate (globulin).

TABLE XI.
Experiments with the fractions of serum protein.

Methods of fractionating the serum protein	Serum fraction	Result	Contrast (NaCl)
Carbonic acid	{ Albumin	##	—
	{ Globulin	—	—
Muriatic acid	{ Albumin	+	—
	{ Globulin	—	—
Ammonium sulphate	{ Albumin	##	—
	{ Globulin	—	—
Control (heated serum)		##	—

Both fractions were dialized in parchment sacks for the elimination of salts for 24 hours in running water and then were isotonic by the addition of 8.5% saline solution.

Both the globulin and the albumin portions thus obtained were tested for cold-hemolytic power as before.

The results were almost the same as in the foregoing two experiments.

XII. INFLUENCE OF VARIOUS PHYSICAL AND CHEMICAL
TREATMENTS UPON THE COLD-HEMOTOXIN IN
THE NORMAL SERA.

In this experiment, rabbit serum and chicken erythrocytes were always employed as materials, and the results were seen at 0°C after 6 hours.

A. Influence of physical treatments.

1. *Filtration.*

In order to determine whether this hemolytic substance is able to pass through a Chamberland's filter or not, I have performed the experiment as follows; after the hemolytic serum (the serum diluted to 1/10 with 0.85% NaCl solution and heated for one half hour at 90°C) was filtrated by Chamberland's filter L₁, L₂ and L₃, these filtrates were examined as to their hemolytic powers as before.

As table 12 shows, the cold-hemolytic agents can not pass through any of Chamberland's filters.

2. *Resistance to sunlight.*

The cold-hemolytic serum of rabbit was placed in colourless test tubes and exposed to the direct sunlight for three days. The decrease in the amount of serum due to evaporation was corrected by adding distilled water up to the original volume.

The experiment when carried out in this way, showed a marked decrease in the cold-hemolytic power of serum by exposure to the sunlight, while on the other hand, no appreciable influence of sunlight could be observed when the unheated fresh serum had been exposed to the sunlight, and when the sun heated serum was heated afterwards.

3. *Resistance to ultra-violet rays.*

After the cold-hemolytic serum of rabbit placed in the Petri dish had been exposed to ultra-violet rays for one or one half hour

at a distance of 36 cm, its cold-hemolytic power was examined.

It was found that the cold-hemolytic power of serum is lessened a little when experimented on in this way, while the cold-hemolytic power remains unchanged if the same treatment is applied to the unheated serum.

4. *Resistance to shaking.*

After the cold-hemolytic serum of rabbit had been shaken for two hours in an electric shaking apparatus which makes 180 excursions per minutes, its cold-hemolytic action was examined.

Neither the cold-hemolytic serum (heated serum) nor the unheated serum underwent any appreciable change in cold-hemolytic power.

5. *Resistance to drying.*

The cold-hemolytic serum of rabbit was dried in a Faust-Heim's drying apparatus. The dry residue was then dissolved in the original volume of physiological salt solution and the hemolytic power of the fluid was examined.

It was found that the cold-hemolytic power remarkably diminishes when the heated serum is dried, whereas the dried unheated serum can manifest a strong cold-hemolytic power when dissolved in NaCl solution and suitably heated.

B. Influence of chemical treatments.

1. *Effect of acid.*

The unheated fresh normal serum of rabbit was mixed with an equal amount of N/10 hydrochloric acid and left at room temperature (about 20°C) for twenty hours. It was then neutralized by adding an equal amount of N/10 solution of caustic soda, and made isotonic by adding 8.5% NaCl solution.

The serum treated in this way showed no alteration in its property of producing cold-hemotoxin when heated suitably.

2. *Effect of alkali.*

The cold-hemolytic serum was mixed with an equal volume of N/10 solution of caustic soda and left at room temperature for twenty hours.

Immediately before the examination, it was neutralized with N/10 hydrochloric acid, and made isotonic by the addition of 8.5% soline solution.

Such a chemical treatment was also found to cause a slight decrease in the cold-hemolytic power of serum.

3. *Effect of ether.*

After the hemolytic serum was mixed with five volumes of ether, and left at room temperature for twenty hours, the ether was com-

TABLE XII.
Influence of physical and chemical treatment upon the hemolytic substance.

Kinds of treatment	Kinds of serum	Result	Contrast (Before treatment)
Filtration by Chamberland's filters	H. S	—	##
Exposure to sunlight	{ H. S	+	##
	{ N. S	##	
Exposure to ultra-violet rays	{ H. S	##	##
	{ N. S	##	
Shaking	{ H. S	##	##
	{ N. S	##	
Drying	{ H. S	+	##
	{ N. S	##	
Treatment with ClH	N. S	##	##
Treatment with NaOH	N. S	##	##
Treatment with ether	{ H. S	+	##
	{ N. S	##	
Treatment with chloroform	{ H. S	+	##
	{ N. S	##	

H.S.—Heated serum

N.S.—Native serum

pletely removed by evaporation and the residue was restored to the original volume with the physiological saline solution.

The power of cold-hemolysis in the heated serum thus treated was found to have been remarkably decreased. But, on the contrary, in the experiment with the unheated serum treated in a similar way there was almost no change in its hemolytic property.

4. *Effect of chloroform.*

The same treatment with chloroform gave quite the same result as in the case of ether.

From the foregoing experiments, it is obvious that this hemolytic substance is pretty resistant against various physical and chemical treatments when the serum is treated in its fresh state, whereas the resistance is remarkably weakened when the serum is heated.

XIII. COLD-HEMOTOXIN IN LONG STORED SERUM.

The results of the above mentioned experiments have all been obtained with the fresh sera of various animals. I have investigated in the following experiments the influence of long storing the serum upon the cold-hemolytic power of heated serum.

Four kinds of serum samples; that is, native unheated serum, untreated serum containing 0.5% carbolic acid, heated serum (90°C) and heated serum containing 0.5% carbolic acid were prepared. They were stored in the ice-box for a long time, and then the experiment of cold-hemolysis was carried out with these stored sera.

The results are shown in table XIII.

As will be seen in the table, the cold-hemolytic substance very quickly disappears in the heated serum when no antisepticum is added. In such a sample of serum, the cold-hemolysis did not occur 10 days after the preparation of sample. On the contrary, the ability of producing the cold-hemolytic substance on heating has been preserved for a pretty long time in the native unheated

TABLE XIII.

Experiment of cold-hemolysis with long stored sera.

Kind of serum	Addition of carbolic acid	Days of storing					
		10	20	30	40	50	60
Unheated serum	{ -	+++	++	++	-	-	-
	{ +	++	++	++	+	+	+
Heated serum	{ -	-	-	-	-	-	-
	{ +	++	++	++	++	++	++
Contrast (fresh heated serum)		++	++	++	++	++	++

serum even if no antisepticum was added.

In such a sample of serum, the cold-hemolysis took place even after 30 days of storing. Such results may be due to the antiseptic property of the fresh serum itself.

When antisepticum is added, the cold-hemolytic substance is preserved in both serum samples (that is, heated and unheated sera) for a very long period of time.

CONCLUSIONS.

1. The cold, non-complementary hemolysis which is caused by the heated normal serum is the strongest in rabbit serum. It is weaker in the chicken- and pig serum, and the weakest in the serum of man, goose, cattle, etc..

2. The degree of cold-hemolysis differs considerably with the sorts and the quantity of erythrocytes added even in one and the same serum.

3. The normal sera, heated at 90°C, manifest the strongest cold-hemolysis, and the sera heated at temperatures departing from this limit react gradually more weakly.

4. The cold-hemolysis by the heated normal sera occurs only at temperatures below 5°C. For the largest part of sera hemolyses only at 0°C.

5. The length of heating time has little influence upon the strength of cold-hemolysis by the heated normal sera.

6. The cold-hemolysis by the heated normal sera of rabbit begins to appear already twenty minutes after mixing the erythrocytes with sera, and becomes gradually stronger with the lapse of time until it reaches its highest degree within about 5 hours.

7. The strength of cold-hemolytic power of heated normal serum varies greatly with individual animals.

8. The ordinary hemolytic amboceptor of serum has nothing to do with the cold-hemolysis. The latter occurs even in the serum entirely freed from hemolytic amboceptor.

9. This hemolysis appears also in the isotonic solutions of various neutral salts such as KCl, KNO₃, and KBr but not in the solutions of sulphates.

10. In the isotonic saccharose solution, the cold-hemolysis can not manifest itself.

11. The substance causing cold-hemolysis exists in the albumin fraction of serum and not in the globulin.

12. This hemolytic substance does not go through Chamberland's filters.

13. When the serum is exposed to the direct sunlight for three days, the power of cold-hemolysis is markedly weakened in the heated serum, while it is well preserved if the serum is not previously heated.

14. Such is also the case when the serum is exposed to the ultra-violet rays for 30 minutes or one hour at a distance of 36 cm.

15. Shaking the serum for 2 hours does not influence the cold-hemolytic power of serum.

16. When the heated serum is dried up, its power of causing cold-hemolysis is greatly affected, whereas no such influence of drying is observed when the serum is dried without being previously heated.

17. Treating the serum with N/10 HCl or with N/10 NaOH does not cause any appreciable change in the power of cold-

hemolysis.

18. When the heated serum is treated with ether or chloroform for 2 hours, its power of causing cold-hemolysis is distinctly diminished.

I wish to express my indebtedness to Professor K. Yamakami for his kind direction and encouragement during my experiments.

REFERENCES.

- Toshima (1931): *The Journal of Biochemistry*, **13**. No. 2.
Yoshida (1928): *Shakai Igaku Zasshi*, No. 499.

ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DEN CALCIUMSTOFFWECHSEL. (IV).

Calciumausscheidung im Kot bei Zufuhr von Cholsäure.

VON

KANZI FUZIWARA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu).

(Eingegangen am 2. März 1931)

Bekanntlich geschieht die Ausscheidung des Calciums in der Hauptsache durch den Darm. Nach Zucker (1921) lässt die Art der Ernährung die Kalksalze mehr im Kot oder mehr im Harn zur Ausscheidung gelangen. Besonders hervorzuheben ist, dass bei jeder Störung der Fettresorption der Gehalt des Kotes an Kalk vermehrt wird, da ein grosser Teil des gespaltenen Fettes in Gestalt von Kalkseifen zur Ausscheidung gelangt. Umgekehrt wird wohl bei günstiger Fettresorption der Gehalt des Kotes an Kalk vermindert.

Es ist schon bekannt, dass die Fettresorption des Darmes nach dem Wielandschen Choleinsäureprinzip (1916) vor sich geht, wie Brugsch und Fränkel (1923) mit ihren Experimenten bewiesen haben.

Seit Schiff und Stadelmann ist bekannt, dass die Gallensäure die Gallen- und Gallensäureausscheidung fördert. Wenn sich die Gallensäure in der Galle vermehrt, so muss die Resorption des Fettes im Darm in einem gewissen Grade begünstigt werden. Die Folge davon ist eine Herabsetzung der Kalkausscheidung im Kot, obwohl die vermehrte Gallensäure im Darm den Gehalt des Calciums in der Galle steigern kann, wie Kawada (1931) in seinem Versuch bewiesen hat, der zeigt, dass die Zufuhr von Gallensäure beim Hunde die Kalkausscheidung in der Galle vermehrt.

In hiesigem Institut hat Sekitoo (1929, 1930) gefunden, dass sich das Calcium in Harn und Blut durch die Zufuhr von Gallensäure vermehrt, und dass die Gallensäure mit dem Calciumstoffwechsel in innigem Zusammenhang steht.

In oben erwähntem Sinne habe ich die Kalkausscheidung im Kot bei Zufuhr von Gallensäure untersucht, um einen genaueren Einblick in das Wesen der Hypercalcämie und der vermehrten Kalkausscheidung im Harn bei Zufuhr von Gallensäure zu bekommen. Durch die Untersuchung von Okamura (1929) wurde festgestellt, dass die Gallensäureausscheidung in der Galle sowohl durch subcutane als auch durch perorale Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird.

Daher habe ich die Kalkausscheidung im Kot des Hundes bei subcutaner Zufuhr von Gallensäure beobachtet.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Methodik.

Zum Versuch wurden gut genährte gesunde Hunde verwendet, die immer geformten Kot entleerten. Vor dem Versuch wurden sie wenigstens 2–3 Wochen lang mit folgender bestimmter Nahrung gefüttert:

Die tägliche Nahrung bestand aus Reis: 300 g, getrockneten Fischchen: 70 g, Gemüse: 30 g, Shoyu (aus Sojabonen): 20 ccm und Wasser: 1000 ccm (Versuch 1–4), im anderen Fall (Versuch 5–7) aus Reis: 200 g, Fleisch: 50 g, Gemüse: 20 g Shoyu. 20 ccm und Wasser: 1000 ccm.

Der Versuch wurde erst begonnen, als das Körpergewicht der Hunde konstant geworden war. Die Abgrenzung des Kotes geschah mit Karmin, und zwar in der Weise, dass am Vortage 0.3–0.5 g Karmin mit der Nahrung gefüttert wurde. Die Schlussbegrenzung geschah in der gleichen Weise.

Der Versuch wurde in drei Perioden: Vor- Nach- und Versuchsperiode, geteilt; bei der Versuchsperiode wurden den Hunden 2.0–

2.5 cem einer 1%igen Natriumcholatlösung pro kg Körpergewicht subcutan verabreicht, und der Calciumgehalt im Kot der 3 Perioden miteinander verglichen.

Die täglichen Faeces pro Periode wurden gewogen, mit 30 cem Wasser in einer Reibeschale gut gerührt, bis das Ganze breiartig gleichmässig verteilt war, und dann wieder gewogen. 1 g davon wurde im Tiegel im Trockenschrank bei 120°C 2 Stunden lang getrocknet und dann im elektrischen Ofen vorsichtig verascht.

Das Calcium der Asche wurde nach der modifizierten Methode von De Waard (1919, 1924) als Oxalat ausgefällt; die ausgefällten Oxalate wurden mit Kaliumpermanganat titrimetrisch bestimmt. Nachdem der tägliche Calciumgehalt der Faeces in der Vorperiode ungefähr konstant geworden, und während 2 Tagen Natriumcholatlösung subcutan injiziert worden war, um den Einfluss derselben auf den Gehalt des Calciums im Kot zu prüfen, folgten nun zum abermaligen Vergleich 3–4 Tage ohne Darreichung von Natriumcholat. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

ERGEBNISSE.

Aus den Versuchen 1–7 ergibt sich, dass der Calciumgehalt der Faeces durch Zufuhr von Cholsäure im Vergleich zu dem der Vor- und Nachperiode sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual deutlich herabgesetzt wird. Nachdem der durchschnittliche tägliche Wert des Calciumgehaltes im Kot pro Periode berechnet worden war, habe ich diese Werte miteinander verglichen. Aus den Versuchen 1–4 und 5–7 sieht man, dass der durchschnittliche tägliche Calciumgehalt der vorperiodischen Faeces 2.03 g bei Fischzusatz zu der Nahrung, 0.216 g bei Fleischzusatz, und der der nachperiodischen 1.846 g bei Fischzusatz, 0.185 g bei Fleischzusatz beträgt, während der der versuchsperiodischen Faeces 1.592 g bei Fischzusatz, 0.159 g bei Fleischzusatz zeigt.

Durch Zufuhr von Cholsäure wird also der Calciumgehalt der Faeces, verglichen mit dem der Vorperiode um 21.58–26.39% und

Versuch 1.

Datum	Körpergewicht (kg)	Faeces (g)	Ca				Bemerkung
			g		%		
				durchschnittlich. Wert		durchschnittlich. Wert	
(1930) 8/Mai	13.500	85	2.2770	2.0687	2.67	2.51	2 ccm Na-cholat- lös ← " "
9	13.360	92	2.5620		2.78		
10	13.400	75	1.5355		2.04		
11	13.390	75	1.9005		2.54		
12	13.500	83	1.2882	1.4749	1.55	1.65	
13	13.350	94	1.6616		1.76		
14	13.520	62	1.4628	1.7913	2.35	2.52	
15	13.370	57	1.1049		1.93		
16	13.500	64	2.2037		3.44		
17	10.510	101	2.3938		2.37		

Versuch 2.

14/Juni	12.100	52	1.9008	2.0399	3.65	3.42	
15	12.200	62	1.8630		3.00		
16	12.000	64	2.2347		3.49		
17	12.120	61	2.1612		3.54		
18	12.050	64	1.5322	1.5506	2.39	2.02	← 2 ccm Na-cholat-lös.
19	12.000	95	1.5690		1.65		← " "
20	12.100	67	1.5859	1.5644	2.36	2.64	
21	12.120	59	1.4907		2.52		
22	12.300	76	1.6012		2.10		
23	12.230	55	1.5797		2.87		

Versuch 3.

20/Sep.	12.200	66	1.3398		2.03		
21	12.380	82	1.5088	1.3617	1.84	1.80	
22	12.195	81	1.3527		1.67		
23	12.260	76	1.2464		1.64		
24	12.080	83	1.0126	1.0775	1.22	1.20	2.5 ccm Na-cholat- lös.
25	12.120	93	1.1424		1.19		" "
26	12.200	94	1.5228		1.62		
27	12.230	78	1.3416	1.4628	1.72	1.82	
28	12.210	70	1.2370		1.81		
29	12.220	80	1.7200		2.15		

Versuch 4.

24/Oct.	14.600	107	2.7841		2.62		
25	14.470	102	2.4708	2.6499	2.42	2.48	
26	14.500	112	2.7559		2.46		
27	14.560	103	2.5891		2.44		
28	14.490	108	2.0424	2.2653	1.89	2.16	2.5 ccm Na-cholat- lös.
29	14.550	102	2.4882		2.43		" "
30	14.610	142	2.6748		1.88		
31	14.600	96	2.4576	2.5659	2.56	2.33	
1/Nov.	14.500	100	2.6270		2.62		
2	14.620	110	2.5044		2.27		

Versuch 5.

10/Nov.	13.800	110	0.2310		0.21		
11	14.000	88	0.2904	0.2578	0.33	0.27	
12	14.100	96	0.2784		0.29		
13	14.000	89	0.2314		0.26		
14	14.170	85	0.1530	0.1585	0.18	0.19	2.5 ccm Na-cholat- lös.
15	14.200	82	0.1640		0.20		" "
16	14.150	84	0.2324		0.28		
17	14.120	87	0.2436	0.2195	0.28	0.26	
18	14.160	83	0.1826		0.22		

Versuch 6.

21/Dez.	10.700	80	0.1728		0.21		
22	10.640	77	0.1800	0.1861	0.23	0.22	
23	10.710	74	0.1615		0.22		
24	10.650	99	0.2300		0.23		
25	10.590	77	0.1588	0.1590	0.20	0.20	2 cem Na-cholat- lös.
26	10.700	81	0.1592		0.19		” ”
27	10.600	76	0.1711	0.1691	0.22	0.23	
28	10.720	82	0.1659		0.22		
89	10.680	55	0.1392		0.25		
30	10.700	95	0.2002		0.21		

Versuch 7.

(1931) 2/Jan.	10.690	74	0.1606		0.21		
3	10.720	90	0.2452	0.2036	0.27	0.25	
4	10.660	82	0.2262		0.25		
5	10.690	72	0.1824		0.25		
6	10.600	92	0.1650	0.1591	0.18	0.18	2 cem Na-cholat- lös.
7	10.710	84	0.1532		0.17		” ”
8	10.700	65	0.1448	0.1679	0.22	0.23	
9	10.580	58	0.1242		0.21		
10	10.630	99	0.2294		0.23		
11	10.720	66	0.1732		0.26		

verglichen mit dem der Nachperiode um 13.54–14.0% vermindert. Der durchschnittliche Calciumgehalt der vorperiodischen Faeces bei Fischzusatz beträgt 2.55% und bei Fleischzusatz 0.25%, während der der nachperiodischen bei ersterem 2.28% und bei letzterem 0.24% zeigt. Der durchschnittliche prozentuale Calciumgehalt bei Zufuhr von Cholsäure beträgt bei Fischzusatz 1.76% und bei Fleischzusatz 0.19%.

Daher wird der prozentuale Calciumgehalt der Faeces bei Zufuhr von Cholsäure sowohl bei Fischzusatz als auch bei Fleischzusatz

herabgesetzt, und zwar bei ersterem um 0.52–0.79% und bei letzterem um 0.05–0.06%.

Aus diesem Ergebnisse ist zu schliessen, dass der Calciumgehalt der Faeces von der Art der Nahrung abhängig ist und durch Zufuhr von Cholsäure sowohl bei Fischzusatz als auch bei Fleischzusatz herabgesetzt wird. Dieser verminderte Calciumgehalt der Faeces bei Zufuhr von Cholsäure beruht, wie mir scheint, auf der verminderten Kalkausscheidung im Darm.

Also kann man den Schluss ziehen, dass die Zufuhr von Cholsäure das Calcium mehr im Harn und in der Galle, aber weniger im Kot zur Ausscheidung gelangen lässt. In der Tat haben Sekitoo (l. c.) und Kawada (l. c.) bewiesen, dass die Zufuhr von Cholsäure eine Hypercalcaemie beim Kaninchen herbeiführt und die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle vermehrt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Kalkausscheidung im Kot ist von der Art der Nahrung abhängig.

2. Die Kalkausscheidung im Kot wird durch die Zufuhr von Cholsäure sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual herabgesetzt.

Aus den Daten geht hervor, dass die Zufuhr von Cholsäure das Calcium mehr im Harn und in der Galle, aber weniger im Kot zur Ausscheidung gelangen lässt.

LITERATUR.

- Brugsch, Th. u. Fränkel, E. (1923): Zeitschr. f. die gesamte experim. Medizin, **38**, 398.
De Waard, D. J. (1919): Biochem. Zeitschr., **97**, 176.
Hoppe-Selyer u. Tierfelder (1924): Handbuch d. physiolog. u. patholog. chemisch. Analyse, 9 Aufl. 657.
Okamura, Teiji (1929): Arbeiten aus der Med. Univ. Okayama, **1**, 387.
Sekitoo, T.: Journ. of Biochem., **11**, 251 (1929). 391 (1930).
12, 59 (1930).
Wieland H. u. Sorge, H. (1916): Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**, 1.
Zucker, T. F. (1921): Proc. soc. exp. biol. u. med., **18**, 272.

BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF MOSAIC IN SOLANUM TUBEROSUM.

By

R. C. MALHOTRA.

(Department of Biology, St. Mary's College, St. Marys, Kansas, U.S.A.)

(Received for publication, March 15, 1931)

INTRODUCTION.

Among all the phytopathological diseases, which are being studied at present, mosaic has invited the most attention. Reports from current literature include newer plants in this respect. In spite of such economic importance of mosaic diseases and their intensive study, our knowledge of their cause is far from complete. They possess two distinct characteristics, however; namely, (1) mottling of the plant, due to alternating patches or spots of light, green or yellow and dark green color, and (2) the highly infectious character of the saps of the diseased plants, even after filtration through mentles that exclude all bacteria. Both of these peculiarities have been summarized by Heald (1926).

Mosaic seems to be of decided interest to biochemists, because no definite cause has been assigned to it. There are numerous theories in the phytopathological literature assigned to the causal agent of this disease, namely, enzymatic theory, virus theory, bacterial theory, protozoan theory and others. Of them all, a little experimental work has been done with the first one, namely the enzymatic theory. It seems reasonable to assume that before any attempt may be made in this direction, it pays to undertake thorough biochemical studies, which might indicate the nutritional metabolism of the host. Since mosaic plants respond to environmental conditions, physically and chemically, as brought out by

the researches of Mulvania (1926), it also seems reasonable to study the biochemical factors. This author for the most part has confined himself to the physical phase of the disease.

Since Wood's (1899) first proposal of mosaic being due to the presence of excessive oxidizing enzymes, many investigators such as Allard (1916), Freiberg (1917) and Mulvania (1926) have supported this viewpoint. Andriewsky (1914), Mrowka (1912) working on chicken pest independently and using different methods, came to the conclusion that the virus is a globin. As similar suggestion has been made by Sangiorgi (1914). Mulvania (1926) thinks that, virus of tobacco mosaic may be a non-living thing, possibly a very simple colloid of a proteinaceous nature and having enzymatic characteristics.

If Mulvania's view be granted as valid as well as the conclusions from many experiments, that virus is multiplied, how can both be possible in case the mosaic is non-living? One would have to assume mosaic to be a result of the metabolic activities of the host itself under abnormal environmental influence (virus), produced by other plants similarly effected. In auto-catalysis, there are many examples of that nature as recorded by Haas and Hill (1929). It is a common record in botanical laboratories, that enzymes break down the reserve materials like starch, as it takes place in the grain endosperm during germination, which perhaps is also auto-catalysis. The parallel multiplication ratio of the bacteriophage and the bacteria, which it lyses during the lytic phenomenon, supported by other evidence, is being regarded as an auto-catalysis by an increasing number of investigators. Certain manifestations, such as incubation period, modification of the virus in different hosts, the correlation between the progress of the disease and cell division of the meristem tissue and the fact that the plant neither recovers nor is killed by the diseases, supports this assumption. This and the second hypothesis, namely, the difference between the living and the non-living has been fully discussed by Mulvina in supporting the enzymatic theory.

From these few but rather convincing evidences, it seems to the writer, that this field of mosaic diseases, command a promising future and may therefore be thoroughly investigated. However, before undertaking any such attempt, it was proposed to study a biochemical analysis of mosaic and healthy plant. The data derived therefrom may be helpful in the elucidation of some factors to be presented in later articles of this series.

REVIEW OF LITERATURE.

In biochemical and phytopathological publications, there does not appear to be any report of complete chemical analysis of mosaic potato plants, although a number of investigators have collected data on some chemical aspects of mosaic plants other than potato. Yet potato probably is one of the most important of the domesticated crops.

Jodi, Edward and True (1918), and Jodi, Moulton and Markley (1920), studied the nitrogen metabolism in normal and mosaic spinach. They did not seem to find any noteworthy decrease in total nitrogen in spinach mosaic.

True and Hawkins (1918) investigated carbohydrate production in healthy and blighted spinach. Campbell (1925) also determined carbohydrate fraction in potato leaf roll. They found decrease in these chemical constituents instead. However, Woods (1899, 1902) states, that the mosaic disease of tomato and tobacco is characterized by an accumulation of starch in the leaves. From these findings he has proposed a theory that an abnormally high starch increase may be a characteristic of mosaic diseases in general. Tollenaar (1925) also seems to agree with this. Thus it is evident that True and Hawkins and Campbell's findings do not support the theory proposed by Woods (1899). Recently Allyn (1926), Brewer, Kendrick and Gardner (1926), have also presented some data, which seem to indicate, that Woods theory may not be as sound as it was first assumed to be.

There are some workers who analyzed sugars in various mosaic crops. For instance, Asuncion (1925) worked with sugar cane in the Philippines and found 24 per cent less sugar in the diseased plants. On the other hand, Lopez (1919) studying the same crop in Porto Rico, found very little effect of mosaic on the sugar content of cane juice. Loew (1900) states, that in the case of tobacco, there is much less albumin in the mosaic leaves when compared with the non-mosaic leaves.

Brewer, Kendrick and Gardner (1926) investigated the effect of mosaic on carbohydrate and nitrogen content of tomato plant under various conditions and with different types of mosaics. In nearly all cases of their study, the mosaic plants were characterized by a reduction of total weights, and, under all conditions, by a reduction in total carbohydrate content as shown by chemical analysis. They found the reduction mainly in polysaccharides. They did not find any reduction in the nitrogen content.

From the review of literature, it seems safe to infer, that at present, workers engaged in the biochemical phase of the mosaic diseases, do not agree in their conclusions. The problem is made more difficult, because the synthesis of sugars depends directly on photosynthesis, in which the rôle of chlorophyll is of tremendous importance. It has been shown by a number of workers, that condensation of sugars gives rise to polysaccharides (starch, hemicelluloses, pentosans, cellulose). Several authors, such as Müntz (1886), Leclerc du Sublon (1895, 1896), Gerber (1897), Ivanow (1912) and others have shown that in many seeds, accumulation of oil is accompanied by a corresponding decrease in carbohydrates. This indicates that not only oils but also proteins may also be derived from carbohydrates as mentioned by Mathews (1930). Any disturbance to chlorophyll may eventually effect the amount or character of these chemical constituents either in part or in whole. Thus one would have to look primarily upon chlorophyll as it is effected by mosaic. There are many workers whose findings are rather painstaking in this respect.

Dickson (1925) has shown that there is a decrease in and a degradation of the chloroplasts in the chlorotic areas accompanied by a decrease in carbohydrates. His work, however, is mostly qualitative in nature. Elmer (1925) has indicated quantitatively, that tomato mosaic greatly altered the composition of the chlorophyll. Miss Eckerson (1926) and Miss Sorokin (1926) have demonstrated cytologically, that there may be a disintegration of the chloroplasts in tomato plants. The latter author also seems to point out the susceptibility of the mosaic leaf chloroplasts to certain chemicals, further indicating a constitutional difference in the two types of chlorophyll.

Recently Cook (1930), working with sugar cane, tobacco, tomato and cowpeas, showed that chlorotic areas, caused by mosaic, are thinner, palisade undeveloped and the mesophyll is reduced. He also stated that, chloroplasts are reduced both in size and number in the young leaves. He thinks that chlorophyll disturbance is due to inhibition and not due to disintegration, as is stated by the above mentioned authors.

Some interesting cytological and bacteriological investigations have been made by Nelson (1930) with reference to common bean mosaic and rugose mosaic on refugee. He used freehand, unstained sections from petioles. He seems to have observed minute organisms in chloroplasts and in the cytoplasm of phloem, xylem and parenchyma tissues of diseased plants. According to his investigation, invaded chloroplasts first appear as a small vacuolized area containing the organism. The chloroplasts are eventually destroyed and the organism is found in abundance in the plastid tissues.

All these authors seem to point out various disturbances of the chloroplasts by different methods of attack as employed by them. Since chloroplasts is an apparatus involved in the synthesis of carbohydrates, it is not surprising that a reduced carbohydrate content was found by many authors in a great many varieties of plants suffering from mosaic. Some authors have reported a

decrease in polysaccharides only. This seems reasonable since they are condensation products of sugars, which are first manufactured during photosynthesis. If the sugars are not produced in excess of the plant requirements, it is not difficult to see that only polysaccharides may be decreased, effecting very little, if any, the quantity of sugar present.

EXPERIMENTAL.

Healthy Burbank potato tubers were cut and planted in the greenhouse of Saint Mary's college, St. Mary's Kansas. The pots containing these plants were divided into two lots and allowed to grow for 5 weeks. Lot I was kept in conditions free from mosaic; while lot II was later infected with a juice extracted from a typical true tomato mosaic plant. It is very essential that such a mosaic be classified more specifically, since Johnson (1926) clearly brings out by transmission experiments and symptomatology in the potato virus group that a dozen or more apparently distinct viruses exist. However, this field remains unexplored as yet, although a strong headway has been made already.

Two dozen plants, half of which were infected with mosaic for 10 days and the other half apparently free from any visible disease, were selected, cut just above the soil and weighed. They were dried first for 1 hour at 80°C to kill all the enzymes present in order to decrease chemical activities to a minimum, then dried at 60°C till a constant weight was obtained. From the figures, the percentage of moisture content, as well as the total fresh and dry weight of the plants, was arrived at.

The choice of one and a half month's old potato plants instead of more matured ones, as used by the author, was justified, for two main reasons. First, because the plants are very young at this stage of growth; thus the reserve organic material manufactured by the leaves does not store in the underground portion of the plant or very little if at all. Second, because the photosynthetic power of an older and matured leaf, decreases. The writer's (1931) work

seems to bring out this fact very strongly while working with 4 different species of cultivated garden plants. If there be any merit in this work, it seems reasonable to assume that any increase or decrease of sugars or other carbohydrates assigned to mosaic leaves may be due to the disease or may be due to the age of the leaves. It is very important to consider relative time factors in problems of this sort, where two similar factors are involved.

The dried plants were cut into small pieces, ground in Wiley mill and so pulverized in ball mill, that the powder could pass through a screen of 60 meshes per inch. Such a fine powder was shown to be essential for the quantitative determination of many plant materials. For detail refer to Malhotra's (1930) original paper in this connection. One plant did not yield enough material for complete chemical analysis, so two plants were employed, thus making 6 complete duplicate analyses of healthy as well as of mosaic plants. This number was assumed to be sufficient for the present study.

First the powders were extracted with petroleic ether by means of Soxlet's extracting apparatus. This fraction yielded ether soluble content such as pigments (chlorophyll), oils, waxes and fats. The use of petroleic ether was preferred over any other reagent for this determination because it does not dissolve the oxidized acids and theobromine, hence should be used for strictly accurate results. This has been recommended by Lewkowitsch (1921).

The residue, left after ether soluble fraction, was extracted with 50 percent ethyl alcohol for 24 hours. The alcohol soluble sugars so obtained were determined by picric acid colorimetric method developed by Walter and Dutcher (1924). The aliquots had first been clarified by mercuric nitrate and sodium carbonate. All non-reducing sugars were inverted by the official hydrochloric acid method (1925). The residue was boiled, made into a thin paste and 5 cc. saliva was added to each sample. The flasks were put into an incubator, which was maintained at 25°C for 24 hours. This

period was long enough for starch hydrolysis as shown by iodine test. The sugars after digestion were removed by filtration, inverted as before and determined by Walter's (1924) picric acid method. Use of saliva appears to yield better results as experienced by many workers, particularly Gardner (1929).

After the removal of starch, hemicelluloses were determined by boiling the residue with 2.5 per cent hydrochloric acid for 4 hours according to the official method (1925). Since Clements (1929) and others have shown the need of a uniform procedure of heat, Malhotra's (1931) suggestions were followed. Cellulose and other materials were calculated by difference.

Total nitrogen was determined by the Arnold-Gunning's modification of Kjeldahl method as outlined by Mathews (1930). Ash was estimated by completely burning the powder in the electric muffle.

Heat energy of the powders was determined in calories by the Burgess Parr oxygen bomb calorimeter. A briquette of the powder (about 0.5 gm) was made in a small press and placed in the small combustion crucible inside the bomb. The electrodes of the bomb cap were connected with special fuse wire having a calorific value of 1,150 calories per gram. The wire was weighed before and after combustion, the difference being computed in calories, which sum was later subtracted from the total calorific value of the sample.

The bomb was sealed tight and oxygen was allowed to enter at a pressure of 25 atmospheres. It was afterwards placed in the bucket of the calorimeter containing 2 liters of water, and the bomb electrodes were connected with the electric currents, which ignited the sample. The stirrer was run at 150 R.P.M. Before ignition of the sample, 5 readings were taken, allowing sufficient time for the water to establish temperature equilibrium. After ignition, ten more readings, each a minute apart were taken. The measurement of the maximum rise of temperature is very essential in this respect, as was pointed out previously by Malhotra (1931)

in "Protoplasma". Beckman's thermometer (20th of a degree scale) was used. The difference in centigrade degrees multiplied by 2,000 (volume of water used) yielded total calories of heat produced by the sample.

The bomb was thoroughly washed and HNO_3 formed was liberated to determine the extra amount of energy developed by the nitrogen present when burned in pure oxygen rather than under ordinary conditions. It has been proven that of every cc. of sodium carbonate solution (3.652 gm to a liter) one caloric should be deducted from the total value. For every gram of the fuse wire burned, 1150 calories were also deducted. After making all these corrections, the total calories were divided by the weight of the sample and calculations were made as calories per gram of the sample. Throughout the course of this study, Poole (1918) was consulted. The data of this and other analyses were presented according to Fisher's (1930) statistical methods.

DISCUSSION OF RESULTS.

The experimental data obtained from this study, have been presented in the table. It appears from the figures presented in column II, that in every case healthy plants were heavier than the diseased plants. It was not only true for fresh weight but also for dry weights (column III) although the moisture content was somewhat more in healthy plants. Since the dry weight of an organism, especially of plants is a better measure of growth as demonstrated by Malhotra (1930), it is reasonable to infer that on the whole, healthy potato plants made better growth than the diseased ones.

Column IV shows the percentage of dry matter. These figures are higher in favor of mosaic plants both individually as well as collectively. This seems reasonable, because the percentage of moisture is higher in healthy plants, although both net dry and fresh weights of healthy plants are also greater. Such behavior as has been shown by mosaic plants seems to be in accordance with the known facts. If the percentage of dry matter in mosaic plant is com-

paratively higher, the water content is lower. Since the normal activity of a plant cell depends on a sufficient amount of water, either maintaining turgidity or by bringing about various chemical reactions such as hydrolysis, the lower percentage of water or higher percentage of dry matter present in host, may in part, account for less growth made by the diseased plants. Importance of water, osmotic pressure and turgidity for the normal functions of cells has recently been discussed by Searth and Lloyd (1930) and Barton-Wright (1930), who may be referred to for further details.

Figures in column V indicate that the percentages of ether extract (oils, chlorophyll, carotin and xanthophyll etc.) are also higher in healthy plants. It was also observed by colorimetric test that this fraction was a darker green in healthy plants while it was comparatively paler in the diseased ones. Since synthesis of organic matter (particularly carbohydrates) depends on chlorophyll, at least in part, directly or indirectly, the other data supports such a point of view. For instance, percentages of total carbohydrate except cellulose (column XIII) were also higher for healthy plants or were lower for mosaic plants.

Percentages of reducing sugars (column VI) did not show any difference collectively, although individually some healthy plants were higher and some were lower than mosaic plants in this respect. On the other hand, non-reducing sugars, as represented by column VII were higher in healthy plants. This seems to hold for every plant as well as for the average. The difference was big enough to be excluded from the danger of an experimental error. The total sugars were also higher in healthy plants.

How would one account for the same magnitude of reducing sugars, although all other carbohydrates higher than hexoses are greater in healthy plants? If one considers hexose as the first sugar of photosynthesis, at least on pure chemical grounds, it would be expected that both kinds of plants may possess the same percentage. We do not know at what stage and under what condi-

tions these sugars are transformed into other reserve materials. Biochemists as well as physiologists do not agree on this point yet. However, if a possibility, that the presence of sugars is due to the results of upward reactions (condensation) starting from carbon dioxide and water and not due to the downward reactions (hydrolysis) of reserve carbohydrates, such as starch, inulin and other polysaccharides, be assumed, it is not difficult to agree with this view. Even those who contradict this idea, have not as yet produced sufficient convincing experimental data in this respect. In the most accepted work, Blackman (1919) suggests, "that a hexose is first formed sugar and that a state of equilibrium exists between hexose and sucrose:—



When the concentration of hexose reaches a certain value, it is converted into sucrose. Hence the value of the hexose is practically constant in amount and this is the condition which has been found to exist". The writer's present data seem to support Blackman's suggestion.

Starch, in percentages as well absolute amount, (refer Column VIII) also seems to be higher in healthy plants. The same also seems to hold for hemicelluloses (column IX). However, there is more increase of hemicelluloses than starch in favor of healthy plants as a result of the disease. Recently Murneck (1929) and Clements (1929) have stressed the importance of hemicellulose as reserve materials in plant economy. If it be so, these figures indicate a decided loss of hemicelluloses due to the potato mosaic.

Percentages of nitrogen (column X) seem to be greater in mosaic plants while they are decidedly lower in normal plants. This holds for all plants studied as well as for their averages. It is in accord with the findings of many workers with other crops, as was already mentioned.

Percentages for ash, (Column XIV) is about the same in both kinds of plants. Other materials, such as cellulose, pectin, pentosans

TABLE—Effect of a typical potato mosaic on the weight, reserve materials, moisture content, ash and calorific heat of the host.

No. and Condi- tion of Plant	Fresh weight	Dry weight	% of dry matter	% of ether extract	% of alcohol soluble sugars	% of nonreduc- tion sugars	% of starch	% of hemicell- uloses	% of nitrogen	% of other materials (by difference)	Calories per gram	Total carbohy- drates except cellulose	% of ash.
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Healthy	1. 83.2	9.90	11.90	8.38	1.08	2.21	12.71	13.82	3.01	53.91	5781	29.82	1.88
	2. 86.9	10.48	12.06	8.44	1.13	2.23	11.96	14.00	3.11	57.22	5785	29.32	1.91
	3. 88.1	10.70	12.14	8.29	1.19	2.30	12.56	15.80	3.23	54.79	5773	31.85	1.84
Average of 6 plants	85.73	10.36	12.09	8.41	1.11	2.26	11.61	14.23	3.14	57.35	5781	29.21	1.89
Mosaic	1. 63.9	7.86	12.30	7.71	1.11	2.03	10.67	9.98	4.53	62.11	4259	23.79	1.86
	2. 61.1	7.55	12.36	7.62	1.09	1.83	10.04	10.62	4.48	62.41	4241	23.58	1.91
	3. 56.8	6.95	12.24	7.56	1.16	2.14	11.11	10.91	4.34	61.0	4262	25.32	1.87
Average of 6 plants	59.3	7.50	12.65	7.63	1.11	2.00	10.98	10.80	4.42	61.17	4248	24.89	1.89

Note: 1—Since both the healthy and mosaic potato plants showed a similar analysis, details of only 3 plants have been given in the table. However, gross averages have also been given.

2—Figures under 0.005 have been calculated as 0.00 while over 0.005 as 0.01.

3—All calculations are based on dry weight basis.

etc., not analyzed (because of their inertness and hence of lesser importance in this respect) are more in the diseased than in the healthy plants.

Calories of heat per gram (column XII) seem to be greater in healthy than in sick plants. This seems evident, because percentages of oils (ether extract) and total carbohydrates except cellulose (which has not been estimated) are higher in the former, while nitrogen and inert materials are dominant in the latter. The yield of caloric energy is maximum in oil and certainly more in lower than in higher carbohydrates, such as cellulose. The little more energy produced, due to greater percentage of proteins in sick plants, may have been compensated for the large percentages of other reserve materials present in normal plants.

SUMMARY.

1. Biochemical study of healthy and mosaic tomato plants has been undertaken.

2. Fresh and dry weights of the plants were taken. Ether extract (oils, chlorophyll), alcohol extract (reducing sugars), non-reducing sugars, starch, hemicellulose, total carbohydrates, nitrogen, ash and calorific heat were determined quantitatively.

3. The data seem to indicate that healthy plants made better growth both on fresh and dry weight basis. However, the percentage of dry matter was higher for the mosaic plants.

4. Percentages of ether extract, non-reducing sugars, starch, hemicelluloses and calories of heat per gram were higher for healthy plants; while nitrogen, inert materials, including cellulose, were higher in diseased plants. Percentages of ash and reducing sugars was practically alike in both kinds of plants.

5. Some suggestions for such biochemical results as shown by these plants have been made.

6. There is a need for more thorough study in this connection which might elucidate the causal agency or the mechanism of mosaic diseases.

It is a pleasure to acknowledge the co-operation shown by Mr. Ray Glynn, M. Sc., Research Assistant, Biology Department of this institution.

LITERATURE CITED.

- Allard, H. A. (1916): Jour. Agr. Res., **6**, 649.
 Allyn, W. P. (1926): M. Sc. thesis submitted to Purdue University, Lafayette, Indiana. (Quoted from Phytopath., **16**, 843.)
 Andriewsky, P. (1914): Centbl. Bakt., **75**, 90.
 Assuncion, S. (1925); Philippine Agr. Review, **18**, 33.
 Barton-Wright, E. C.: Recent advances in plant physiology. P. Blackiston's Son and Co., Inc. (1930).
 Blackman, V. H. (1919): Ann. Bot., **33**, 353 quoted from Barton-Wright's recent advances in plant physiology., 157, (1930).
 Brewer, P. H., Kendrick, J. B. and Gardner, W. M. (1926): Phytopathology, **16**, 843.
 Clements, H. F.: Ph. D. thesis University of Chicago (1929); also Bot. Gaz. (1930).
 Cook, M. T. (1930): Phytopathology, **20**, 142.
 Dickson, B. T. (1925): Science, **62**, 398.
 Eckerson, S. H. (1926): Bot. Gaz., **81**, 204.
 Elmer, O. H. (1925): Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bul., **82**, 39.
 Fisher, R. A. (1930): Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd, London.
 Freiberg, G. W. (1917): Ann. Missouri Bot. Gard., **4**, 175.
 Gardner, F. E. (1929): Plant Physiology, **4**, 405.
 Gerber, C. (1897): Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), t. 125, **18**, 658.
 Haas, P. and Hill, T. G. (1929): An introduction to the Chemistry of plant products. Longmans Green and Co., London, 1.
 Heald, F. D. (1926): Manual of plant diseases. McGraw-Hill Book Co. New York.
 Ivanow, S. (1912): Bot. Centbl., Abt. 1, **28**, 159.
 Jodidi, S. I., Kellogg, E. H. and True, R. H. (1918): Jour. Agr. Res., **13**, 385.
 Jodidi, S. I., Moulton, C. S. and Markley, K. S. (1920): Jour. Amer. Chem. Soc., **42**, 1061.
 Johnson, J. (1926): Phytopathology, **16**, 745.
 Leclerc du Sablon, M. (1895): Rev. Gen. Bot., t. 7, **76**, 145.
 „ (1896): Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), t. 123, **24**, 1084.
 Lewkowitsch, J. (1921): Chemical technology and analysis of oils, fats and waxes. 6th Ed. 1, Macmillan and Co., London.

Biochemical Investigation of Mosaic in *Solanum Tuberosum*. 487

- Loew, O. (1900): U. S. Dept. Agr. Office of the Secretary, Rept., **65**, 1.
- Lopez, F. A. (1919): Jour. Dept. Agr. Porto Rico, **3**, 47.
- Malhotra, R. C. (1930): Jour. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **2**, 398.
- „ (1930): Jour. Ind. Bot. Soc., **9**, 218.
- „ (1931): Protoplasma, Berlin, 12, March (In Press).
- „ (1931): Some suggestions for reliable quantitative determination of hemicelluloses. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. (In press).
- „ (1931): Photosynthetic power of young and old leaves of some garden plants. (Unpublished).
- Mathews, A. P. (1930): Physiological Chemistry. 5th Ed. William Wood and Co., New York.
- Mrowka, S. (1912): Centbl. Bakt., **67**, 249.
- Mulvania, M. (1926): Phytopathology, **16**, 853.
- Mureneck, A. E. (1929): Plant Physiology. **4**, 251.
- Müntz, A. (1886): Ann. Sci. Nat. Bot. **7**, t. 3, 45.
- Nelson, R. (1930): Phytopathology, **20**, 133.
- Official and tentative method of analysis of the association of agricultural chemists. Ed. II, 535. Assoc. Off. Agr. Chemists, (1925).
- Poole, H. (1918): The calorific power of fuels. 3rd Rev. Ed. John Wiley and Sons, New York.
- Sangiorgi, G. (1914): Centbl. Bakt., **72**, 70.
- Scarsh, G. W. and Lloyd, F. E. (1930): General Physiology. John Wiley and Sons, New York.
- Sorokin, H. (1926): Phytopathology, **16**, 66.
- Tollenaar, D. (1925): Lab. Landbou- en Scheikunde Wageningen Lab. Pflanzenphysiol. Onderzoek **12**, 1.
- Walter, T. and Dutcher, R. A. (1924): Jour. Amer. Chem. Soc., **46**, 1662.
- Walter, T. (1924): Jour. Amer. Chem. Soc., **46**, 1670.
- Woods, A. F. (1899): Centralb. f. Bakt. u. Par. II Abt., **5**, 745.
- „ (1902): U. S. Dept. Agr. Bur. Plant. Ind. Bul., **18**.

A COLD-HEMOTOXIN, NEWLY DISCOVERED IN THE HEATED SERUM.

Part III.

Experiments on its Chemical Nature and on the Influence of Substances Inhibiting other Sorts of Hemolysis.

By

KATUO TOSHIMA.

*(From the Department of Forensic Medicine, Hokkaido Imperial University,
Sapporo, Japan. Director: Prof. K. Yamakami.)*

(Received for publication, March 16, 1931)

INTRODUCTION.

In the previous paper (Toshima, 1931 i, ii) I have reported the the results of my investigations on the non-complementary hemolysis which is caused by the heated immune and the heated normal sera at low temperatures.

In the present work, I have undertaken some experiments on the chemical nature of the substance in the heated serum which causes the coldhemolysis, and have also tried to determine the influence of various substances which have hitherto been reported by other investigators to inhibit other sorts of hemolysis upon this peculiar one.

I. EXPERIMENTS ON THE SALTING-OUT OF COLD-HEMOTOXIN BY MEANS OF $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

When the rabbit serum is saturated to various degrees with $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, various fractions of serum protein are obtained as precipitate.

The precipitate obtained in this way was dissolved in 0.85% NaCl solution of 10 times the original volume of serum. And the experiment of cold-hemolysis was carried out with these solutions.

It was proved that none of the solutions of precipitate thus obtained contains the substance causing cold-hemolysis as is shown in table I.

TABLE I.
Experiment with a fraction of serum protein separated by $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Degree of saturation with $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Kinds of treatment of the fraction	Reacting temperature (C)			
		37°	20°	5°	0°
100 %	{ Heated	—	—	—	—
	{ Not heated	—	—	—	—
80 %	{ Heated	—	—	—	—
	{ Not heated	—	—	—	—
60 %	{ Heated	—	—	—	—
	{ Not heated	—	—	—	—
50 %	{ Heated	—	—	—	—
	{ Not heated	—	—	—	—
Contrast (serum)	Heated	—	—	—	—

II. EXPERIMENT ON ITS SOLUBILITY IN ALCOHOL, ACETON, ETHER AND CHLOROFORM.

In order to determine whether this hemolytic substance has a lipoid or a proteid character, I have examined its solubility in various solvents dissolving lipoid substances.

96% alcohol, aceton, ether and chloroform were chosen as solvent.

3.0 cc. of rabbit serum were powdered by drying in Faust-Heim's apparatus at room temperature. The powder was poured into 30.0 cc. of alcohol, and placed in an incubator for twenty hours. The extract was then freed from the solvent by evaporating it in the drying apparatus and the residue was dissolved in 0.85% salt solution of 10 times the original volume of serum. The residue of serum-powder was suspended in 30.0 cc. of 0.85% salt solution after every trace of solvent had been completely evaporated.

In a similar way, the extract with acetone, ether and chloroform was prepared.

The two sorts of solutions above obtained (extract solution and residue solution) were heated for 30 minutes at 90°C and then their hemolytic power was examined as before at 37°, 20°, 5° and 0°C.

As a contrast the two solutions were examined at the same time without being heated previously, because it is necessary to know whether this hemolytic substance is produced by heating the solution or not.

The results are shown in table II.

TABLE II.
Experiment on the solubility in lipid-dissolving solvents.

Kinds of solvents	Extracted parts	Previous treatment	Reacting temperature(C)			
			37°	20°	5°	0°
Alcohol	{ Extract	{ Heated	##	—	—	—
		{ Not heated	##	—	—	—
	{ Residue	{ Heated	—	—	—	+
		{ Not heated	—	—	—	—
Acetone	{ Extract	{ Heated	##	—	—	—
		{ Not heated	##	—	—	—
	{ Residue	{ Heated	—	—	—	+
		{ Not heated	—	—	—	—
Ether	{ Extract	{ Heated	##	—	—	—
		{ Not heated	##	—	—	—
	{ Residue	{ Heated	—	—	—	+
		{ Not heated	—	—	—	—
Chloroform	{ Extract	{ Heated	±	—	—	—
		{ Not heated	±	—	—	—
	{ Residue	{ Heated	—	—	—	+
		{ Not heated	—	—	—	—
Contrast (serum)		Heated	—	—	—	##

As will be noticed in the table, the solution prepared with the extract causes a marked hemolysis. (In the case of chloroform extract, the hemolysis is weak.) But this hemolysis is not the cold-hemolysis which we are dealing with in the present work, because it occurs always at 37°C and not at lower temperature. Besides it takes place in the solution of extract without regard to the previous heating of the solution.

This hemolysis is probably due to some hemolytic lipid akin to lecithin in the rabbit serum.

The substance which causes the cold-hemolysis remains in the residue.

The solution prepared with the residue of extraction manifests in all cases hemolysis at 0°C and not at higher temperatures, though the degree of hemolysis is more or less weaker than the control. Moreover this sort of hemolysis occurs only in the solution which was previously heated, and not in the unheated solution.

Thus it has been evidently proved by this experiment, that the substance causing the cold-hemolysis in the heated serum does not belong to lipid.

III. EXPERIMENT ON THE HEMOLYSIS BY LECITHIN.

On this occasion, I have made some experiments on the hemolysis by lecithin, and compared the results with the cold-hemolysis by heated serum, because it is well known that lecithin is contained in serum and can cause a sort of hemolysis, and besides, as has been described in the previous experiment, the extract of serum with lipid-dissolving solvents causes a sort of hemolysis, which is very probably attributable to lecithin.

For this purpose, lecithin (Merck) was dissolved in the heated alcohol to 0.1%, and this alcoholic solution was diluted with NaCl solution.

To 0.45 cc. of various dilutions of lecithin solution one drop of 5% chicken erythrocytes was added. The mixture was placed at 37°, 20°, 5° and 0°C for 6 hours. At the same time the heated

lecithin solution (for 30 minutes at 90°C) was experimented on in a similar way in order to know whether the heated lecithin solution can cause some peculiar sort of hemolysis or not.

The results are shown in table III.

TABLE III.
Hemolysis by lecithin.

Kinds of lecithin solution	Experimented temperature (C)	Dilution of lecithin solution							
		1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000
Lecithin solution without heating	37°	C	C	C	NC	W	Tr	—	—
	22°	NC	M	W	Tr	—	—	—	—
	5°	NC	M	W	Tr	—	—	—	—
	0°	M	M	W	Tr	—	—	—	—
Heated solution	37°	C	C	C	C	NC	M	W	Tr
	22°	C	NC	M	W	W	—	—	—
	5°	C	NC	M	W	W	—	—	—
	0°	C	NC	M	W	Tr	—	—	—

C=complete hemolysis; NC=nearly complete hemolysis;

M=marked hemolysis; W=weak hemolysis;

Tr=trace of hemolysis; (—) no hemolysis.

The heated lecithin solution causes the hemolysis a little stronger than the unheated one, but the degree of hemolysis by lecithin solution is always the strongest at 37°C and becomes gradually weaker with the lowering of reacting temperatures, i. e., lecithin does not cause the cold-hemolysis, even when heated at 90°C.

Moreover, it is to be seen in the table that lecithin can cause hemolysis even at 0°C if the solution is concentrated, but in the dilute solution the hemolysis occurs only at 37°C.

In the next experiment, the lecithin hemolysis was investigated with lecithin solution added to the serum of man or rabbit in order to determine the behaviour of lecithin hemolysis in the presence of

serum, for it is very conceivable that the existence of serum in the medium may alter the art of lecithin hemolysis.

The results of the experiment, however, showed that the existence of serum in the medium has no appreciable influence upon the art of lecithin hemolysis.

IV. THE EFFECT OF REMOVING PROTEIN FROM SERUM UPON ITS COLD-HEMOLYTIC POWER.

It has been evidenced by the experiments so far described as well as by those reported in Part II, that the substance causing cold-hemolysis belongs neither to lipid substance nor to serum globulin, and can not be salted out from the serum with $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, and that it exists in the albumin fraction of serum. Now, in the albumin fraction there are contained besides albumin also crystalloids and non-protein colloids.

I have, therefore, tried in the following experiments to determine definitely whether this substance belongs to protein or not.

For this purpose, the effect of removing off the serum-protein upon the cold-hemolytic power was investigated.

1. *Method of sulphosalicylic acid.* To 2.0 cc. of rabbit serum, 6.0 cc. of distilled water and 2.0 cc. of 50% solution of sulphosalicylic acid were mixed. After being well shaken, the mixture was filtered. The filtrate was transparent and its Millon's reaction was slightly positive, but the biuret reaction, xanthoprotein reaction, sulphosalicylic reaction etc. were all negative.

The filtrate was neutralized with 5% sodium bicarbonate solution and its volume was made up to 10 times the original volume of serum, and made isotonic by adding NaCl. The experiment of cold-hemolysis was carried out with this solution.

2. *Method of trichlor acetic acid.* To 2.0 cc. of rabbit serum, 4.0 cc. of distilled water were added and then 4.0 cc. of 20% trichlor acetic acid solution were mixed. When the mixture was filtered after a thorough shaking, transparent filtrate which showed no reaction of protein, was obtained. It was neutralized and made

isotonic as above, and experimented with.

3. *Method of uranium acetate.* To 2.0 cc. of rabbit serum, 6.0 cc. of distilled water and 2.0 cc. of uranium acetate solution were mixed and then filtered after a thorough shaking.

The filtrate was quite transparent and its protein reaction was all negative. This filtrate was treated as above and the experiment of cold-hemolysis was made with it.

4. *Method of KH_2PO_4 .* To 1.0 cc. of rabbit serum, 4.0 cc. of M/3 KH_2PO_4 solution were added.

The mixture was boiled and filtered immediately after the coagulation of protein. The filtrate was almost transparent and its protein reaction was all negative. This was neutralized with the solution of M/3 Na_2HPO_4 and made isotonic as before.

5. *Method of methyl alcohol.* 1.0 cc. of rabbit serum was dropped into 10.0 cc. of methyl alcohol and after the mixture had been left at room temperature for one hour, it was filtered. In this filtrate, two drops of 10% alcoholic solution of zinc chloride were added and again filtered after 30 minutes. The filtrate was evaporated in a Faust'Heim's apparatus and then dissolved in 10.0 cc. of 0.85% NaCl solution. The protein reaction of this filtrate was all negative.

The solutions thus freed from protein were examined as usual.

As is shown in table IV, the cold-hemolysis occurred in none of the solutions, indicating that the cold-hemolytic substance is precipitated together with the protein of serum.

V. EXPERIMENT ON THE DIALYSABILITY.

As has been so far proved, the cold-hemolytic substance belongs neither to lipoid nor to globulin, and is precipitated together with the protein of serum.

It is, therefore, very probable that it may belong to albumin.

If this presumption is correct, it must be undialysable. And, in fact, the undialysability of cold-hemolytic substance can be demonstrated experimentally, as is shown in table V.

TABLE IV.
Experiment with sera freed from protein.

Reagents used for eliminating protein	Heated or not	Experimented temp. (C)				Protein reaction			
		37°	20°	5°	0°	Sulpho. reaction	Biuret reaction	Millon's reaction	Xanthoprot. reaction
Sulphosalicylic acid	Heated	-	-	-	-	-	-	+	-
	Not heated	-	-	-	-	-	-	-	-
Trichlor acetate	Heated	+	-	-	-	-	-	-	-
	Not heated	+	-	-	-	-	-	-	-
Uranium acetate	Heated	-	-	-	-	-	-	-	-
	Not heated	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphoric acid salt	Heated	-	-	-	-	-	-	-	-
	Not heated	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl alcohol	Heated	-	-	-	-	-	-	-	-
	Not heated	-	-	-	-	-	-	-	-
Control (serum)	Heated	-	-	-	#	-	-	-	-

TABLE V.
Experiment with dialysed serum with addition of NaCl.

Sort of serum	Reacting temperature(C)			
	37°	20°	5°	0°
Dialyzed serum	—	—	—	##
Undialyzed serum	—	—	—	##

VI. EXPERIMENT WITH GLYCOGEN, METAL COLLOID AND SILICIC ACID.

Beside the protein substances there are contained in the serum other colloidal substances such as glycogen, metal colloid, silicic acid, etc..

It has, therefore, been investigated whether these colloids cause the cold-hemolysis or not.

1. *Glycogen*. 0.1% solution of glycogen in the physiological salt solution was examined on its hemolytic ability in the heated for as well as in the unheated state. As erythrocytes, those of chicken were employed.

The results were always negative.

2. *Metal colloid*. As metal colloids, Electrocuprol (Clin) and Iron elecloid (Kokko) were used. 1% solution in the physiological salt solution was made with these colloids and examined as in the case of glycogen as to the hemolytic power.

The results were always negative.

3. *Silicic acid*. 1% colloidal solution of silicic acid was prepared with the physiological salt solution and examined as to its hemolytic power against the blood-cells of chicken.

The results were always negative.

VII. EXPERIMENT ON THE ADSORBABILITY.

In this experiment, the adsorbability of the hemolytic substance by kaolin, cholesterin and blood-cells has been investigated.

1. *Adsorption by kaolin.* To 2.0 cc. of heated serum of rabbit, 0.1 g of purified kaolin was added.

After these materials were thoroughly mingled, the mixture was placed at 37° and 0°C for 30 minutes. Then it was centrifuged and its clear supernatant fluid was examined as to its hemolytic power.

As a control the unadsorbed heated serum of the same rabbit was used.

The cold-hemolytic power of serum has been entirely lost by the adsorption with kaolin as shown in table VI.

The results were quite the same when 2.0 cc. of unheated native serum of rabbit, diluted to 1/10, was added with 0.1 g of kaolin, treated as above, and the clear supernatant fluid was heated at 90°C for 30 minutes and its cold-hemolytic power was examined.

Thus we see that the cold-hemolytic substance is completely absorbed by kaolin both in the inactive state in the unheated serum and in the activated state in the heated serum.

2. *Adsorption by cholesterin.* To 2.0 cc. of heated or native serum of rabbit, 0.1 g of cholesterin was added. After the mixture was treated as before, a similar experiment was carried out. In this case, this hemolytic substance was adsorbed only a little. (table VI).

3. *Adsorption by blood-cells.* It must be worth investigating whether the cold-hemolytic substance can be adsorbed by blood-cells or not. I have therefore carried out the experiments in the following way.

To 1.0 cc. of heated serum of rabbit, 0.1 cc. of 100% washed chicken blood-cells were added. After these materials were thoroughly mixed, the mixture was placed at 37°C for 30 minutes, and at 0°C for 10 minutes, being shaken now and then. Then it was centrifuged and its clear supernatant fluid was examined as to its hemolytic power.

For contrast the unadsorbed heated serum of the same rabbit was used.

TABLE VI.
Experiment on the adsorbability.

Sort of absorbant	Heated or unheated	Temperature of adsorption (C)		Contrast
		37°	0°	
Kaolin	{ Heated serum	—	—	##
	{ Native serum	—	—	
Cholesterin	{ Heated serum	##	##	##
	{ Native serum	##	##	
Blood-cells	{ Heated serum	—	—	##
	{ Native serum	##	##	

As is shown in table VI, the cold-hemolytic substance can be completely adsorbed by blood-cells, not only at 0°C but also 37°C.

On the contrary, however, when 1.0 cc. of native serum of rabbit inactivated by heating at 56°C and diluted to 1/10 and 0.1 cc. of 100% chicken blood-cells are mixed and treated as above, the clear supernatant fluid manifests the same power of cold-hemolysis as before the adsorption, if heated afterwards at 90°C for 30 minutes.

Thus we could demonstrate a very interesting fact in this experiment that the hemolytic substance combines with erythrocytes only when it is in the active state or only in the heated serum, while it does not react with erythrocytes in the least so long as it remains in the inactive state in the unheated serum, and moreover that it can combine with erythrocytes even at 37°C if it is in the active state.

VIII. DISCUSSION ON THE NATURE OF SUBSTANCE CAUSING THE COLD-HEMOLYSIS.

To summarise the results of experiments made on the nature of substance causing the cold-hemolysis it may be said that this substance is a protein of albumin character, and completely absorbed

by means of kaolin. Cholesterin can adsorb it only partly. The adsorption of this substance by erythrocytes is very characteristic; that is, it is adsorbed by erythrocytes only in its active state, and not in the inactive state.

IX. THE INFLUENCE OF SUBSTANCES INHIBITING OTHER SORTS OF HEMOLYSIS UPON THE COLD-HEMOLYSIS.

As is well known, substances such as lipoid, serum, bile, protein, etc. can influence various kinds of hemolysis. It is, therefore, interesting to investigate whether these substances exert the same influence upon the cold-hemolysis as upon other sorts of hemolysis.

The following experiments deal with this problem.

1. *Influence of the fresh normal serum.* The fact is known long since that the normal fresh serum inhibits various hemolytic processes.

Since Ehrlich (1898) discovered in 1898 the inhibition of the hemolytic action of tetanus-toxin by the normal horse serum, many investigations have been reported of the anti-hemolytic action of normal sera.

Kraus and Clairmont (1901) found that tetanolysin and staphylolysin are inhibited by the normal horse serum; vibriolysin and staphylolysin, by the normal pig serum. Neisser (1900), Neisser and Wechsberg (1901) reported that the serum of horse and man has the power of inhibiting the hemolytic action of staphylococci. Lubenau (1901) obtained the same result with the serum of sheep, goose, goat, guinea-pig, etc.. Madsen (1899) reported also such anti-hemolytic action of the serum of pig and horse against tetanolysin. But Kraus (1906) could not recognize the inhibitory substance against choleralysin in the serum of pig and goat.

Eisler (1905) in testing the anti-hemolytic action of serum albumin, recognized that it has the same inhibitory power against tetanolysin and staphylolysin as serum. Seligmann (1908)

found that such action of serum was possible when it was inactivated by heating. By the investigation of Motomura (1928), it has been elucidated that the sera of various animals (goat, buffalo, horse, rabbit, guinea-pig, etc.) have the anti-hemolytic action against *sotto bacillus* and staphylococci and that such action is strengthened when the serum is inactivated by heating at 56°C. Serum-albumin can inhibit the hemolytic action of staphylococci, but not that of *sotto bacilli*.

The normal serum has also the inhibiting action against saponin hemolysis. Ransom (1901) discovered that such action of serum is to be attributed to cholesterin. Meyer (1908) reported that serum albumin and globulin have no anti-hemolytic action against saponin. Motomura showed that the sera of various animals can inhibit the hemolytic action of saponin and that such anti-hemolytic action is mainly due to lipoid, i. e., cholesterin and lecithin.

The inhibiting action of normal serum against the hemolysis by soap and bile salts has been studied by numerous workers such as Liebermann (1907), Bayer (1907), Lüdke (1906), Noguchi (1907) and Meyer (1908).

Now, what kind of influence will the fresh normal serum have upon the cold-hemolysis?

As experimental materials, I have employed the fresh normal serum of rabbit, guinea-pig, horse, chicken, goose and man.

To 0.5 cc. of the heated serum of rabbit (for 30 minutes at 90°C) 0.4 cc. of various dilutions of the fresh normal sera and 2 drops of 5% emulsion of chicken erythrocytes were mixed. After the mixture had been placed at 0°C for 6 hours, the results were read.

At the same time the mixture consisting of 0.5 cc. of hemolytic serum of rabbit, 0.4 cc. of the serum heated at 56°C and 2 drops of chicken erythrocytes were employed as contrast.

The results are shown in table VII.

As will be seen in the table, the fresh normal sera of above

TABLE VII.
Anti-hemolytic action of various normal sera against the cold-hemolysis.

Kinds of added serum	Treatment added serum	Dilution of added serum								Contrast (serum)
		1	5	10	20	40	80	160	320	
Rabbit	Fresh	+°	—	—	—	—	+	##	##	##
	Heated at 56°	—	—	—	—	+	+	##	##	
Guinea-pig	Fresh	+°	—	—	—	—	+	##	##	##
	Heated at 56°	—	—	—	—	±	+	##	##	
Horse	Fresh	—	—	—	—	—	—	±	+	+
	Heated at 56°	—	—	—	—	—	+	+	+	
Chicken	Fresh	—	—	—	—	—	+	##	##	##
	Heated at 56°	—	—	—	—	—	—	+	+	
Goose	Fresh	+°	—	—	+	+	+	##	##	##
	Heated at 56°	—	—	—	+	+	+	##	##	
Man	Fresh	—	—	—	—	—	—	+	+	##
	Heated at 56°	—	—	—	—	±	+	+	##	

+°=The hemolysis caused by the normal heterolysin in the added serum.

mentioned animals all have a strong power inhibiting the cold-hemolysis.

In the second experiment, I have investigated what fraction of serum protein has such anti-hemolytic action against this hemolysis.

For this purpose, the serum protein was separated into albumin- and globulin fraction by means of ammonium sulphate and the experiment was carried out as before with each of the fractions.

As shown in table VIII, this hemolysis is markedly inhibited by the albumin fraction, but not by globulin.

2. *Influence of lipid.* Various hemolytic processes are much influenced by lipoids and the relationship between hemolysis and lipoids is very complicated.

TABLE VIII.
Influence of albumin- and globulin fractions.

Fraction of serum protein	Dilutions of added fraction					Contrast (serum)	Contrast (NaCl)
	5	10	20	40	80		
Albumin	—	—	—	—	++	##	—
Globulin	##	##	##	##	##	##	—

Lecithin and cholesterin are said to act sometimes antagonistically to each other and sometimes similarly and even by one and the same lipoid the hemolysis is sometimes accelerated, and sometimes inhibited, according to the kinds of hemolysis.

a. Influence of cholesterin. Since Ransom's discovery that the power of dog serum inhibiting saponin-hemolysis is due to cholesterin, the anti-hemolytic action of cholesterin has been studied by many investigators, such as Windaus (1909), Yagi (1910), Abderhalden & Le Count (1905), Walbum (1910) etc.. They asserted that such action of cholesterin is effected by the combination of saponin and cholesterin. Furthermore, the anti-hemolytic action of cholesterin for other kinds of hemolysis has been reported by numerous workers such as Kyes (1903) (hemolysis by cobra-poison), Kyes and Sachs (1903) (hemolysis by cobra-poison, tetanolysin and olive oil), Pascucci (1905) (hemolysis by saponin, solanin, cobra-poison and tetanolysin), Noguchi (1905) (hemolysis by agaricin, saponin, tetanolysin, cobra-lecithin), Hausmann (1905) and Meyer (1908) (hemolysis by saponin), Minz (1908) (hemolysis by viperidin and cobra-poison), and also Meyerstein (1910) (hemolysis by saponin and cobra-poison-lecithin, Motomura (1928) (hemolysis by saponin, sotto bacillus and staphylococci), Mitomo and Sasaki (1929) (hemolysis by cobra-lecithin, saponin, arachnolysin, staphylolysin, urethan, chloral hydrate, chloroform, acidum formicum and sublimate). Kyes and Sachs found later that cholesterin does not inhibit the hemolysis by staphylolysin and arachnolysin.

In the present experiment, I have investigated the influence of cholesterin upon the cold-hemolysis.

The solution of cholesterin was prepared by dissolving 1.0 g cholesterin (Merck) in 10.0 cc. of heated alcohol or by suspending the same amount of cholesterin in 10.0 cc. of the physiological saline solution.

The standard solution of cholesterin thus prepared does not hemolyse the chicken erythrocytes at 0°C, even after 6 hours.

To 0.5 cc. of hemolytic serum of rabbit, 0.4 cc. of various dilutions of cholesterin solution made from the standard solution and 2 drops of chicken erythrocytes were mixed. The mixture was left at 0°C for 6 hours.

As contrast, the mixture of 0.5 cc. of hemolytic serum of rabbit with 0.4 cc. of physiological salt solution and 2 drops of chicken erythrocytes were used.

As table IX shows, the cold-hemolysis is markedly inhibited by cholesterin.

TABLE IX.
Influence of cholesterin upon the cold-hemolysis.

Dilutions of cholesterin solution	100	200	300	400	500	Contrast
Result	—	+	⦿	⦿	⦿	⦿

b. Influence of lecithin. Regarding the influence of lecithin upon various sorts of hemolysis, many investigations have hitherto been made. Arrhenius (1908) found that lecithin inhibits the hemolysis by bile salts. Bayer (1907) reported that lecithin remarkably delays the hemolysis by bile, but not at such a concentration as is contained in serum. Sachs (1908) showed that the hemolysis which is caused by soap is promoted by Lecithin Agfa and inhibited by Lecithol-Riedel. Detre and Sellei (1905) recognized that lecithin increases the resistance of blood-cells against tetanolyisin, if lecithin and serum are mixed. Neufeld

and Handel (1909) found that lecithin has anti-hemolytic power against saponin-hemolysis. Meyerstein (1910) reported that lecithin inhibits slightly the hemolysis of saponin and bile salts, but not that of soap and cobra-poison. Kobert (1904), investigating the inhibiting action of lecithin against saponin-hemolysis, asserted that its action is to be attributed to lecithin-emulsion, produced by the combination of lecithin and saponin. According to Motomura (1928), lecithin inhibits the hemolysis of saponin and sotto bacillus considerably, but that of staphylococci only slightly.

I have studied the influence of lecithin upon the cold-hemolysis.

As experimental materials, 1% emulsion or 1% alcoholic solution of lecithin (Merck) made in the same way as in the case of cholesterin were used. The lecithin solution prepared in this way hemolysed the chicken erythrocytes to the dilution of 1/50000 at 0°C.

To 0.5 cc. of hemolytic serum of rabbit 0.4 cc. of various dilutions (below 1/50000) of lecithin and 2 drops of chicken erythrocytes were mixed. Then the mixture was placed at 0°C for 6 hours.

As shown in table X, the cold-hemolysis is not influenced by lecithin in the least.

TABLE X.
Influence of lecithin upon the cold-hemolysis.

Dilution of lecithin solution	$\frac{1}{50000}$	$\frac{1}{100000}$	$\frac{1}{200000}$	$\frac{1}{400000}$	$\frac{1}{800000}$	Contrast
Result	##	##	##	##	##	##

3. *Influence of egg protein.* According to Motomura (1928), the yolk inhibits strongly the hemolysis of saponin and that of sotto bacillus, but not the hemolysis of staphylococci, and the egg white has no anti-hemolytic power against the hemolysis of saponin

and sotto bacillus, but slightly inhibits that of staphylococci.

In order to know whether the cold-hemolysis is inhibited by egg protein, I have carried out the following experiment.

The yolk solution was made by adding to yolk an equal volume of physiological salt solution. It was rubbed carefully in mortar and filtered with gauze. The filtrate (original solution) was diluted to 1% with the physiological salt solution.

The solution of egg white was also made in a similar way.

And the power of inhibiting the cold-hemolysis of these solutions was determined in the same way as in the case of cholesterin and lecithin.

As table XI shows, the cold-hemolysis is considerably inhibited by the yolk solution, but not that of egg white.

TABLE XI.
Influence of the egg white and yolk upon the cold-hemolysis.

Added substance	Dilutions of egg protein solutions					Contrast
	100	200	300	400	500	
Egg yolk	—	—	±	+	≡	≡
Egg white	≡	≡	≡	≡	≡	≡

4. *Influence of various proteins.* Clark, Zinck and Frank (1921) found that the serum manifests a strong antihemolytic action, if it is digested by trypsin, pepsin and diastase. They attribute its action to the products of decomposition.

According to Ohno (1922), solutions of various proteins such as trypsin, casein, pepton, ovalbumin, etc. have a remarkable power of inhibiting the hemolysis by immune hemolysin of rabbit and the solution of pepton inhibits also the hemolysis by oleic acid and soap. He opines that such action is due to the combination of hemolytic substances with protein.

In order to see the influence of various proteins upon the cold-hemolysis, the following experiments have been carried out.

For this experiment, the following solutions were prepared. Namely:

1. Solution of pepton, trypsin, ovalbumin and pepsin: Pepton (Teruuchi), trypsin (Grübler), coagulable ovalbumin, pepsin (Merek) etc. were dissolved in the physiological salt solution to 1% respectively.

2. Solution of casein: Casein (Hammersten) was dissolved in N/10 NaOH and warmed a while. Then the solution was neutralized with N/10 ClH and made to 1% isotonic by adding NaCl.

To 0.5 cc. of hemolytic serum of rabbit, 0.4 cc. of various dilutions of the above-mentioned original protein-solutions and 2 drops of 5% chicken erythrocytes were added. After the mixture was placed at 0°C for six hours, the result was observed.

As contrast, tests consisting of 0.5 cc. of hemolytic serum of rabbit, 0.4 cc. of physiological salt solution and 2 drops of chicken erythrocytes, as well as tests consisting of 0.9 cc. of each protein solution and 2 drops of chicken erythrocytes were prepared.

The results are shown in table XII.

TABLE XII.
Influence of various proteins upon the cold-hemolysis.

Sorts of proteins	Dilutions of protein solutions					Contrast (serum)	Contrast (protein solution)
	100	200	300	400	500		
Pepton	+	++	+++	+++	+++	++	—
Casein	—	±	++	++	++	++	—
Trypsin	—	+	++	++	++	++	—
Ovalbumin	++	++	++	++	++	++	—
Pepsin	++	++	++	++	++	++	—

The cold-hemolysis is inhibited by pepton up to its dilution of 1/200, by casein to 1/400 and by trypsin to 1/200, but not by ovalbumin and pepsin.

5. *Influence of bile.* Since Bar and Boas have reported about the anti-hemolytic action of icteric serum, numerous investigators have studied on this problem. (Herx and Landsteiner (1910), Kusunoki (1911), Kyes (1903) Minz (1908), Bang (1908), Abderhalden and Le Count (1905), Ishizaka (1907), Takahashi and Furuta (1924), Saito (1919), Takata (1928)). Homma (1921) has proved the anti-hemolytic action of sodium glycocholate.

I have studied the influence of bile and sodium salt of glycocholic acid and that of taurocholic acid (the chief constituents of bile) upon the cold-hemolysis.

For this purpose, the fresh bile of cattle and pig as well as sodium salts of glycocholic- (Merck) and taurocholic acid (Merck) were diluted to 1% with the physiological salt solution.

When these solutions were tested as regards their own hemolytic action against chicken erythrocytes at 0°C after 6 hours, the bile of cattle and pig was proved to have no hemolytic power in its dilution of 1% while both of the sodium salt-solutions hemolysed the erythrocytes up to the dilution of 1/6400.

I have, therefore, added to 0.5 cc. of hemolytic serum of rabbit, 0.4 cc. of various dilutions of 1% bile solution or 0.4 cc. of various dilutions below 1/6400 of the sodium-salt-solutions and 2 drops of 5% chicken erythrocytes.

The results were read at 0°C after 6 hours.

As shown in tables XIII and XIV, the cold-hemolysis is not influenced by any of the experimented substances.

TABLE XIII.
Influence of bile.

Added substance	Dilution of 1 % bile solution					Contrast (serum)
	100	200	300	400	500	
Bile of cattle	##	##	##	##	##	##
Bile of pig	##	##	##	##	##	##

TABLE XIV.
Influence of sodium salts of glycocholic- and taurocholic acid.

Added substance	Dilution of sodium salt solution					Contrast (serum)
	6400	12800	25600	51200	102400	
Sod. glycochol	##	##	##	##	##	##
Sod. taurochol	##	##	##	##	##	##

SUMMARY.

1. The substance causing the cold-hemolysis in the heated normal serum can not be salted out by means of $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

2. It can not be extracted with lipid-dissolving solvents such as alcohol, acetone, ether, chloroform, etc..

3. It is always precipitated with protein when the serum is freed from protein by various methods.

4. It can be entirely adsorbed by kailin and partly adsorbed by cholesterol.

5. It is not dialysable.

6. The non-protein colloids such as glycogen, metal colloid and silicic acid, etc. have nothing to do with the cold-hemolysis.

7. Its adsorption by erythrocytes is very characteristic, that is, the erythrocytes adsorb it only when it is in the active state in the heated serum, while the erythrocytes can not adsorb it from the fresh unheated serum.

8. The cold-hemolysis is markedly inhibited by the fresh unheated sera of various animals (rabbit, guinea-pig, horse, chicken, goose and man).

9. The serum-albumin can inhibit the cold-hemolysis in the same way as serum itself but the serum globulin is not endowed with such a power.

10. The cold-hemolysis is remarkably inhibited by cholesterol, but not by lecithin.

11. It is also inhibited by egg yolk, but not by egg white.

12. The cold-hemolysis is inhibited by various proteins such as pepton, casein and trypsin, but not by ovalbumin and pepsin.

13. The bile of cattle and pig as well as the sodium salts of glycocholic- and taurocholic acid have no influence upon the cold-hemolysis.

I wish to express my indebtedness to Prof. K. Yamakami for his kind direction and encouragement during my experiments.

REFERENCES.

- Abderhalden and Le Count (1905): *Zeitschr. f. exp. Therap.*
Arrhenius (1908): *Biochem. Zeitschr.*, **11**, 161.
Bang (1908): *Biochem. Zeitschr.*, **11**, 521.
Bayer (1907): *Biochem. Zeitschr.*, **5**, 368.
Clark, Zink and Frank (1921): *Ref. Berichte über d. ges. Physiol.*, **11**, 248-249.
Detre and Sellei (1905): *Wien. klin. Woch.*, Nr. 18, 451.
Ehrlich (1898): *Berl. klin. Woch.*, **35**, 273.
Eisler (1905): *Wein klin. Woch.*, Nr. 27, 721 u. Nr. 30, 809.
Hausmann (1905): *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, **6**, 567.
Herx and Landsteiner (1910): *Med. Klinik.*, Nr. 27, 1062.
Homma (1921): *Tokyo Igakkai Zasshi*, **35**, No. 4.
Ishizawa (1907). *Chugai Iji Shimpo*, No. 656.
Kobert (1904): *Beiträge z. Kennt. d. Saponinsubstanzen.*
Kraus (1906): *Centralbl. f. Bakt., Orig.* **41**, 377, 480.
Kraus and Clairmont (1901): *Wien. klin. Woch.*, Nr. 42, 1016.
Kyes (1903): *Berl. klin. Woch.*, Nr. 42, 956.
Kyes and Sachs (1903): *Berl. klin. Woch.*, Nr. 2-4, 57.
Kusunoki (1911): *Tokyo Igakkai Zasshi*, **25**, No. 7.
Lubenau (1901): *Centralbl. f. Bakt.*, **30**.
Liebermann (1907): *Biochem. Zeitschr.*, **4**, H. 1, 25-39.
Lüdke (1906): *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, Abt. I, Orig.* **42**, Nr. 5, 455-462 u. Nr. 6, 552-561.
Madsen (1899): *Zeitschr. f. Hygiene*, **32**, 214.
Meyer (1908): *Arch. f. Hygiene*, **65**, 292-304.
Meyerstein (1910): *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm.*, **62**.
Minz (1908): *Biochem. Zeitschr.*, **9**, 357.
Mitomo and Sasaki (1929): *The Tohoku Journal of exp. Medicine*, **13**, No. 5 & 6, 539.
Motomura (1928): *Taiwan Igakkai Zasshi*, No. 285, 1307.
Noguchi (1907): *Biochem. Zeitschr.*, **6**, 185.

- Noguchi (1905): *Beit. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, **6**, 552.
Neisser (1900): *Deutsch. med. Woch.*, Nr. 49, 790.
Neisser and Wechsberg (1901): *Zeitschr. f. Hygiene*, **36**, 299.
Neufeld and Händel (1909): *Centralbl. f. Bakt., I. Abt.* **42**.
Ohno (1922): *Tokyo Ijishinshi*, No. 2290.
Paseucci (1905): *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, **6**, 552.
Ransom (1901): *Deutsch. med. Woch.*, Nr. 13, 194.
Sachs (1908): *Biochem. Zeitschr.*, **12**, 278.
Saito (1919): *Nippon Biseibutsugakkai Zasshi*, **10**, 399.
Seligmann (1908): *Biochem. Zeitschr.*, **10**, 430.
Takahashi and Furuta (1924): *Nippon Biseibutsugakkai Zasshi*, **18**, 226.
Takata (1928): *Aichi Igakkai Zasshi*, **35**, 165.
Toshima (1931): *The Journal of Biochemistry*, **13**, 291.
Toshima (1931): *The Journal of Biochemistry*, **13**, 441.
Walbum (1910): *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, **7**, Orig. 544.
Windaus (1909): *Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. J. G.* **42**, 238.
Yagi (1910): *Kyoto Igakkai Zasshi*, **7**.

INDEX TO VOLUME XIII.

A

- Absorption, On the CO_2 ——— velocity of NaOH- and KOH- solutions. 211.
- Allantoin, On uric acid and ——— in gastric juice. 1.
- Antikoagulanten, Über die Wirkung der ——— auf die Serumferment und das Komplement. 11.
- Avitaminotischen Diät, Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der ———. 107.

B

- Biochemical investigation of mosaie in *solanum tuberosum*. 473.
- Blattfarbstoffe, Immunologische Untersuchungen über Blattpresssäfte und ———. 273.
- Blattpresssäfte, Immunologische Untersuchungen über ——— und Blattfarbstoffe. 273.

C

- Calciumausscheidung im Kot bei Zufuhr von Cholsäure. 465.
- Calciumstoffwechsel, Über den Einfluss der Gallensäure auf den ———. 465.
- CHIWAKI, Jinji und KAWASHIMA, Yoshikane. Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besondere Berücksichtigung der avitaminotischen

Diät. I. Mitteilung. Über den Einfluss des Cholesterins und des Lecithins auf die Hämoglykolyse. 107.

Cholesterin, Über den Einfluss des ———s und des Lecithins auf die Hämoglykolyse. 107.

Cholsäure, Calciumausscheidung im Kot bei Zufuhr von ———. 465.

Cholsäure, Die Wirkung der ——— auf die Kreatininausscheidung bei Zufuhr verschiedener vegetativer Nervengifte. 237.

CO_2 , On the ——— absorption velocity of NaOH- and KOH- solutions. 211.

Cold-hemotoxin, A ——— - ——— newly discovered in heated serum. 291, 441, 489.

D

Darstellung von Eigelblecithin, Über die ——— - ———. 145.

Diät, Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen ———. 107.

Diphérique, Sur la purification de la toxine ———. 255.

E

Eigelblecithin, Über die Darstellung von ———. 145.

Eigelblecithin, Über die Fettsäuren des ———s. 155, 177.

Extraktionsmethode für Gallensäuren, Über die Nakagawasche ———

aus der Galle und deren theoretische Überlegungen. 321.

F

Fettsäure, Über den Gehalt der Gewebe an —n und unverseifbaren Substanzen unter verschiedenen Bedingungen. 185.

Fettsäure, Über die —n des Eigelblecithin. 155, 177.

FUJIKAWA, Hosaburo und SAKAMOTO, Isamu. Eine Kritik der Nakagawa-Fujikawaschen roten Mikrobestimmungsmethode der Gallensäure in der Galle. 309.

FUJITA, Sei. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. X. Über den Einfluss der Gallensäure und der Phosphate auf die Zuckerassimilation. III. 219.

FURUKUBO, Tomiji und SUEYOSHI, Yuji. Über die Fettsäuren des Eigelblecithins. I. mitteilung. Die gesättigten Fettsäuren. II. Mitteilung. Die ungesättigten Fettsäuren. 155, 177.

FURUKUBO, Tomiji. Über den Gehalt der Gewebe an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen unter verschiedenen Bedingungen. 185.

FUZIWARA, Kanzi. Phosphate im Harn bei Zufuhr von Gallensäure. 43.

FUZIWARA, Kanzi. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel. (IV). Calciumausscheidung im Kot bei Zufuhr von Cholsäure. 465.

G

Galle, Eine Kritik der Nakagawa-

Fujikawaschen roten Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der —. 309.

Galle, Über die Nakagawasche Extraktionsmethode für Gallensäuren aus der — und deren theoretische Überlegungen. 321.

Gallensäure, Der Einfluss der — auf die Salzausscheidung in der Lebergalle. (I). 133.

Gallensäure, Die Bedeutung der — im Kohlehydratstoffwechsel. 219.

Gallensäure, Eine Kritik der Nakagawa-Fujikawaschen roten Mikrobestimmungsmethode der —n, in der Galle. 309.

Gallensäure, Phosphate im Harn bei Zufuhr von —. 43.

Gallensäure, Über den Einfluss der — auf den Calciumstoffwechsel. 465.

Gallensäure, Über die Nakagawasche Extraktionsmethode für —n aus der Galle und deren theoretische Überlegungen. 321.

Gastric juice, On uric acid and allantoin in ——. 1.

Gesättigte Fettsäure, Die ———n des Eigelblecithins. 155.

Glyoxal, The fate of the —s in the animal body. 423.

H

Hämoglykolyse, Über den Einfluss des Cholesterins und des Lecithins auf die —. 107.

Hämoglykolyse, Über die Beeinflussung der — durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen Diät. 107.

Harn, Phosphate im — bei Zufuhr von Gallensäure. 43.

Heated immune serum, The existence of a cold-hemotoxin in — — — — —. 291.

Heated normal serum, The cold, non-complementary hemolysis by the — — — — —. 441.

Heated serum, A cold-hemotoxin, newly discovered in — — — — —. 291, 441, 479.

Hemolysis, Experiments on its chemical nature and on the influence of substances inhibiting other sorts of — — — — —. 479.

Hemolysis, The cold, non-complementary — — — — — by the heated normal serum. 441.

Heterocarboeyclischen Verbindungen, Über das Verhalten einiger — — — — — im Froschorganismus. 343.

Hexosephosphate, The formation of methylglyoxal from — — — — — in the presence of animal tissues. 369.

Hônyô, H. Immunologische Untersuchungen über Blattpresssäfte und Blattfarbstoffe. 273.

I

Immune serum, The existence of a cold-hemotoxin in heated — — — — —. 291.

Immunologische Untersuchungen über Blattpresssäfte und Blattfarbstoffe. 273.

INATSUGU, Y. On uric acid and allantoin in gastric juice. 1.

INOUE, Hiroshi. The formation of methylglyoxal from hexosephosphate in the presence of the animal tissues. 369.

IWANAGA, Yoshio. Über den Einfluss der Narkotica auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 351.

K

KAWADA, Yutaka. Der Einfluss der Gallensäure auf die Salzausscheidung in der Lebergalle. (I). 133.

KAWASHIMA, Yoshikane und CHIWAKI, Jinji. Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen Diät. I. Mitteilung. Über den Einfluss des Cholesterins und des Lecithins auf die Hämoglykolyse. 107.

KOH- solution, On the CO₂ absorption velocity of NaOH- and — — — — —. 211.

Kohlehydratstoffwechsel, Die Bedeutung der Gallensäure im — — — — —. 219.

Komplement, Über die Wirkung der Antikoagulanten auf die Serumferment und das — — — — —. 11.

Konstitution der Polypeptide und proteolytische Ferment. 57.

Kot, Calciumausscheidung im — — — — — bei Zufuhr von Cholsäure. 465.

Kreatininausscheidung, Die Wirkung der Cholsäure auf die — — — — — bei Zufuhr verschiedener vegetativer Nervengifte. 237.

KUSUI, Kenzo. Zur Kenntnis der vergleichenden Biochemie. III. Über das Verhalten einiger heterocarboeyclischen Verbindungen im Froschorganismus. 343.

L

Lebergalle, Der Einfluss der Gallensäure auf die Salzausscheidung in der — — — — —. (I). 133.

Lecithin, Über den Einfluss des Choles-

terins und des —s auf die Hämoglykolyse. 107.

M

MALHOTRA, R. C. Biochemical investigation of mosaic in solanum tuberosum. 473.

MASAKI, Kiyoshi. On the CO₂ absorption velocity of NaOH- and KOH-solution. 211.

Metal, Studies on the effect of —s and metal salts on micro-organisms. 81.

Metal salt, Studies on the effect of metals and — —s on micro-organisms. 81.

Methylglyoxal, The formation of — from hexose-phosphate in the presence of animal tissues. 369.

Microorganism, Studies on the effect of metals and metal salts on —s. 81.

Mikrobestimmungsmethode, Eine Kritik der Nakagawa-Fujikawaschen roten — der Gallensäuren in der Galle. 309.

MIYANOKE, Yasutaro, Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente. 389.

Mosaic, Biochemical investigation of — in solanum tuberosum. 473.

N

Nahrung, Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die —, besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen Diät. 107.

NAKAGAWA, Satoru und YOSHIKAWA, Koichi. Über die Nakagawa-sche Extraktions-methode für Gallensäuren aus der Galle und deren theoretische Überlegungen.

321.

NaOH, On the CO₂ absorption velocity of — and KOH-solutions. 211.

Narkotica, Über den Einfluss der — auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 351.

Nervengifte, Die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung bei Zufuhr verschiedener vegetativer —. 237.

O

OHYAMA, Seiichi, Sur la purification de la toxine diphtérique. 255.

P

Phosphate im Harn bei Zufuhr von Gallensäure. 43.

Phosphate, Über den Einfluss der Gallensäure und der — auf die Zuckerassimilation. III. 219.

Polypeptide, Konstitution der — und proteolytische Ferment. 57, 389.

Purification de la toxine diphtérique, Sur la — —. 255.

S

SAKAMOTO, Isamu und FUJIKAWA, Hosaburo. Eine Kritik der Nakagawa-Fujikawaschen roten Mikrobestimmungsmethode der Gallensäure in der Galle. 309.

SAKUMA, Futoshi. The fate of the glyoxals in the animal body. 423.

Salzausscheidung, Der Einfluss der Gallensäure auf die — in der Lebergalle. (I). 133.

Serum, A cold-hemotoxin, newly discovered in heated —. 291, 441, 489.

Serum, The cold, non-complementary hemolysis by the heated normal —. 441.

Serumferment, Über die Wirkung der Antikoagulanten auf die — und das Komplement. 11.

Solanum tuberosum, Biochemical investigation of mosaic in —. 473.

SUYEYOSHI, Yuji. Über die Darstellung von Eigelblecithin. 145.

SUEYOSHI, Yuji und FURUKUBO, Tomiji. Über die Fettsäuren des Eigelblecithins. I. Mitteilung. Die gesättigten Fettsäuren. 155. II. Mitteilung. Die ungesättigten Fettsäuren. 177.

SUZUKI, Koretaka. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Ferment. 57.

T

TAKU, Aijiro. Die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung bei Zufuhr verschiedener vegetativer Nervengifte. 237.

TANAKA, Kunio. Studies on the effect of metals and metl salts on microorganisms. 81.

TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in heated serum. Part I. The existence of a cold-hemotoxin in heated immune serum. 291.

TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in heated serum. Part II. The cold, non-complementary hemolysis by the heated normal serum. 441.

TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in the heated

serum. Part III. Experiments on its chemical nature and on the influence of substances inhibiting other sorts of hemolysis. 479.

Toxine, Sur la purification de la — diphtérique. 255.

U

Ungesättigten Fettsäure, Die — —n in Eigelblecithin. 177.

Unverseifbare Substanz, Über den Gehalt der Gewebe an Fettsäuren und —n —en unter verschiedenen Bedingungen. 185.

Uric acid, On — — and allantoin in gastric juice. 1.

V

Vegetative Nervengifte, Die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung bei Zufuhr verschiedener ——. 237.

Y

YANAGISAWA, Kaneo. Über die Wirkung der Antikoagulanten auf die Serumferment und das Komplement. 11.

YOSHIKAWA, Koichi und NAKAGAWA, Satosu. Über die Nakagawasche Extraktionsmethode für Gallensäuren aus der Galle und deren Überlegungen. 321.

Z

Zuckerassimilation, Über den Einfluss der Gallensäure und der Phosphate auf die — III. 219.

Zuckerausscheidungsschwelle, Über den Einfluss der Narkotica auf die —. 351.

